

Desarrollo de un método para la evaluación de la viabilidad de polen de *Zea mays* crecido en el Centro Experimental Agrícola y Forestal de la Universidad del Magdalena.

Rafael Segundo Escobar Pallares

Cristhian Adolfo Pérez Ruiz

UNIVERSIDAD DEL MAGDALENA

FACULTAD DE INGENIERÍAS

PROGRAMA DE INGENIERÍA AGRONÓMICA

SANTA MARTA D.T.C.H.

Octubre 2017

Desarrollo de un método para la evaluación de la viabilidad de polen de *Zea mays* crecido en el Centro Experimental Agrícola y Forestal de la Universidad del Magdalena.

Autores

Rafaél Segundo Escobar Pallares

Cristhian Adolfo Pérez Ruiz

DIRECTOR

Catherine Pardey Rodríguez PhD

Proyecto de Investigación presentado como requisito parcial para optar al título de:

Ingeniero Agrónomo

UNIVERSIDAD DEL MAGDALENA

FACULTAD DE INGENIERÍAS

PROGRAMA DE INGENIERÍA AGRONÓMICA

SANTA MARTA D.T.C.H.

Octubre 2017

Dedicatoria

Primero que todo le doy gracias a **Dios** por brindarme la fuerza y paciencia necesaria para sacar a delante este trabajo.

Dedico este trabajo a mis padres **Tima Pallares** y **Sixto Escobar** quienes confiaron en mí para salir adelante profesionalmente, siendo capaz de cumplir todas las exigencias que la Universidad del Magdalena tienen para alcanzar el grado de Ingeniero Agrónomo.

Mis hermanos **Gina Escobar** y **Tomas Escobar** quienes me brindaron un apoyo incondicional, como ejemplo de vida a seguir.

Agradecimientos

Expreso un profundo agradecimiento a todas las personas que con su ayuda han colaborado en la realización del presente trabajo:

Dra. Catherine Pardey Rodríguez, por su dirección y supervisión continúa en su elaboración.

Dra. Paula Andrea sepulveda Cano, por el interés mostrado por nuestro trabajo y la sugerencias recibidas.

Ing. Agr. Raúl Antonio Carbono Mercado, por enseñarnos a realizar las mezclas químicas en el laboratorio.

Gracias al **Ing. Agr. Pedro Antonio Mercado** y la **Ing. Agr. Irma Quintero Pertuz** por donar parte del área de la siembra de maíz de sus prácticas académicas para evaluar en ellas la viabilidad del polen.

Gracias a **Dios** por que derramó bendiciones financieras para cubrir los gastos, multiplicando la dotación de reactivos químicos de los laboratorios del Programa de Ingeniería Agronómica de la Universidad del Magdalena para realizar nuestras pruebas.

Un agradecimiento muy especial a mis **compañeros** y **amigos** Fabio Dagon Bernier, Raúl Carbono, Cesar Buitrago, Eduardo Moscote, Ángel Martínez, Camilo Murillo, Smeir Hamburger, Jesús Matos y Candelaria Hernández por el ánimo recibido y por sus consejos que contribuyeron de manera amena para sacar adelante este proyecto.

CONTENIDO

1. PRESENTACIÓN	9
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	10
3. ANTECEDENTES	11
3.1. MEDIOS DE CULTIVO	12
3.2. MEDIOS DE CULTIVO EMPLEADOS EN OTRAS PLANTAS DIFERENTES A MAÍZ	14
4. MARCO TEÓRICO CONCEPTUAL	17
4.1. LA PLANTA DE MAÍZ Y SU ESTRUCTURA FLORAL.....	17
4.1.1. Inflorescencia masculina.....	18
4.1.2. Descripción del grano de polen.....	20
4.1.3. Inflorescencia femenina	21
4.1.4. Polinización y fertilización	23
4.2. VIABILIDAD POLÍNICA	24
4.3. FACTORES QUE AFECTAN LA VIABILIDAD POLÍNICA	25
4.4. MÉTODOS DE DETERMINACIÓN DE LA VIABILIDAD DEL POLEN.....	27
4.4.1. Germinación <i>in vitro</i>	28
5. JUSTIFICACIÓN	31
6. OBJETIVOS	32
6.1. OBJETIVO GENERAL	32
6.2. OBJETIVO ESPECÍFICO	32
7. DISEÑO METODOLOGICO	31
7.1. UBICACIÓN, SIEMBRA Y DESARROLLO DEL CULTIVO.	33
7.2. RECOLECCIÓN DEL POLEN.....	30
7.3. EVALUACIÓN DEL POLEN DE MAÍZ EN MEDIOS DE CULTIVO <i>IN</i> <i>VITRO</i>	35
8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	38
8.1. SIEMBRA Y DESARROLLO DEL CULTIVO.	38
8.2. RECOLECCIÓN DEL POLEN.....	30

8.3. EVALUACIÓN DEL POLEN DE MAÍZ EN MEDIOS DE CULTIVO <i>IN VITRO</i>	35
9. CONCLUSIONES.....	52
10. RECOMENDACIONES.....	49
REFERENCIAS.....	54

Resumen.

Se estudió la calidad y los posibles efectos de diferentes medios de cultivo sobre la germinación *in vitro* de polen. Se recolectaron muestras de plantas en estado reproductivo, ubicadas en el Centro de Desarrollo Agrícola y Forestal de la Universidad del Magdalena (C.D.A.F). Las muestras de polen purificadas, fueron sembradas en medios de cultivo constituidos por diferentes formulaciones de Agar-Agar, sacarosa, nitrato de calcio y ácido bórico. Los datos obtenidos se procesaron a través de un análisis de varianza con un diseño completamente al azar, con cinco tratamientos y dos replicas en el tiempo correspondiente a dos siembras consecutivas. Se estimó el porcentaje de germinación para cada medio de cultivo, por medio de conteos en 50 granos de polen por campo, sobre cuatro campos por caja Petri, en microscopio compuesto de luz y en el estéreo microscopio Leica. Se utilizó un patrón para evaluar polen por medio de tinción con Acetocarmin, contando 100 granos por placa de un total de 20 placas para las dos replicas. El polen fue recolectado entre los 50 y 54 días posteriores a la siembra de las plantas. La evaluación del polen de los diferentes medios de cultivo se realizó dos horas después de incubados, mientras que los granos teñidos fueron evaluados 24 horas después. El medio de cultivo N ° 4 (0.6% de Agar-Agar, 17% de sacarosa, 0% de ácido bórico y 0.03% de nitrato de calcio) fue el de mejor resultado alcanzando un promedio de 70.13% de germinación y el medio N° 5 (0.6% de Agar-Agar, 25% de sacarosa, 0% de ácido bórico y nitrato de calcio), arrojó los resultados más bajos de 9.18% de germinación del polen. Con Acetocarmin se alcanzó una viabilidad media de 96.3%. Además, se pudo concluir que el polen de maíz presentó dificultad para germinar en los medios de cultivo probados.

Palabras clave: Viabilidad, polen, germinación, maíz.

ABSTRACT

It was studied the quality and the potential effects of different culture media about the *in vitro* germination of pollen. Samples were collected from plants in reproductive status, located in the center of Agricultural Development and Forestry of the University of Magdalena (C.D.A.F). Samples of pollen purified, were sown in culture media consisting of different formulations of Agar-Agar, sucrose, calcium nitrate and boric acid. The obtained data were processed through an analysis of variance with a completely randomized design with five treatments and two replicas in the time corresponding to two sowings consecutively. The percentage of germination for each culture medium was estimated by counts in 50 pollen grains per field, on four fields for Petri dishes, under light microscope and in the Leica microscope stereo. It was used a patter for evaluating pollen by through of staining with Acetocarmine, counting 100 grains per dishes of a total of 20 dishes for the two replicates. Pollen was collected between the 50 and 54 days after sowing the plants. Pollen evaluation of the different culture media was performed two hours after incubation, while the stained grains were evaluated 24 hours later. Culture media of N ° 4 (0.6% of Agar-Agar, 17% sucrose, 0% boric acid y 0.03% calcium nitrate), was the best result reaching an average of 70.13% germination and the medium N° 5 (0.6% of Agar-Agar, 25% sucrose, 0% boric acid y calcium nitrate), produced the lowest results of 9.18% of pollen germination. White Acetocarmine reached a viability average of 96.3%. In addition, it can be concluded that the maize pollen presents difficulty to germinate in this culture media.

Keywords: viability, pollen, germination, maize.

1. PRESENTACIÓN

La calidad del polen es una herramienta de importancia en los Programas de Mejoramiento Genético. El polen suficiente permite obtener semilla. La semilla es producida a través de cruces previamente diseñados, definiendo las plantas hembras y las plantas machos; los machos se caracterizan por ser buenos productores de polen; por lo tanto se debe garantizar flujo de polen de buena calidad y cantidad.

Con el fin de lograr alta producción de semilla, es importante conocer la calidad del polen; lo cual se logra estudiando su viabilidad a través de pruebas en laboratorio, midiendo la germinación *in vitro*, en formulaciones que garanticen su crecimiento y simulen su viabilidad en campo.

Según lo anterior, el trabajo de investigación presenta los resultados de un proyecto que se realizó en la Universidad del Magdalena, en el cual se evaluaron cinco formulaciones base, para determinar la mayor cantidad de granos de polen germinados en forma *in vitro*.

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El maíz es un cultivo de gran importancia económica a nivel mundial y es una de las especies cultivadas más productivas (Paliwal, 2001). Sin embargo, puede presentar bajos rendimientos, entre muchas de las causas se puede asociar al desarrollo reproductivo del cultivo, en el cual se resalta la viabilidad polínica. Diversos autores establecen que la viabilidad del polen influye en la producción y en la calidad de frutos de las especies cultivadas; por ende, es necesario su estudio para el desarrollo de semilla mejorada (Andres *et al.*, 1999., González *et al.*, 2002., Marini *et al.*, 2010., Araméndiz *et al.*, 2013 y Corrazza *et al.*, 2016).

En trabajos sobre maíz criollos procedentes del Magdalena - Colombia, se planificó un esquema de cruzamientos dirigidos en el Centro de Desarrollo Agrícola y Forestal de la Universidad del Magdalena (C.D.A.F); donde no se logró obtener suficiente semilla endocriada en los parentales y en los híbridos (Pardey, 2015). Por lo tanto, surge la necesidad de explorar la calidad del polen de maíz cultivado en la zona. Como paso preliminar se hace necesario estandarizar un medio de cultivo que permita evaluar la viabilidad del polen.

González *et al.*, (2002), afirman que los métodos confiables para determinar la viabilidad de polen son la germinación *in vitro* e *in vivo*; pero Andres *et al.*, (1999) dicen que para los estudios de germinación del polen *in vitro* es necesario ajustar el medio de cultivo. Marini, *et al.*, (2010), consideran que desarrollar un medio de cultivo para que el polen germine es un paso laborioso porque depende del ambiente, las reservas de nutrientes en el grano, y la composición genética del grano, dado que algunas especies requieren de medios de cultivos más complejos que otras.

De acuerdo a lo anterior la propuesta de investigación evaluó cinco formulaciones de germinación *in vitro* de polen de maíz.

3. ANTECEDENTES

La calidad del polen es un parámetro para realizar estudios relacionados con la biología de la polinización, ya que existen procesos de mejora genética y de producción de cultivos que depende de esta variable. El concepto “calidad de polen” se refiere a viabilidad y/o germinación. *Viabilidad* se define como la capacidad que tiene un grano de polen de vivir, crecer, germinar y desarrollarse; y *Germinación de polen* como la capacidad del polen de emitir el tubo polínico en condiciones adecuadas (Rejón *et al*, 2010., Sorkheh *et al.*, 2011).

Para el desarrollo de frutos y obtener semilla; se necesita que el proceso de fecundación se lleve a cabo. Los Programas de Mejoramiento depende de una producción continua de semilla para su evaluación; por ello, constantemente se está evaluando semilla que es producto de cruzamientos dirigidos, que se hacen para explorar la variabilidad genética que tiene la especie y así desarrollar nuevos genotipos adaptados (Ospina y Ligarreto, 2000., González *et al.*, 2002., Davarynejad *et al.*, 2008., Hernández, 2010 y Corazza *et a.*, 2016).

De acuerdo con investigaciones realizadas en el Caribe Colombiano sobre viabilidad de polen Araméndiz *et al.*, (2012) consideran que el estrés en la flor en el momento de la polinización es una de las causas principales de los bajos rendimientos en berenjena. Alcaraz (2009), en Málaga-España, reporta la tasa baja de cuajado del fruto en aguacate atribuyéndola también a la polinización, entre otros factores que van asociados con la floración. Van y Bravo (1974), en trabajos realizados en el Estado de Zulia-Venezuela observaron una gran proporción de mazorcas de maíz sin grano por lo que decidieron estudiar la protandria y viabilidad en el polen. Se encontró que el polen era viable y la protandria sin efecto, ellos sugieren evaluar la durabilidad del polen, la duración de la receptividad de los estigmas en relación con la temperatura y la humedad relativa del aire; como también conocer el efecto del agua en la planta, la fertilización relacionada con fósforo y los micro-elementos.

3.1. MEDIOS DE CULTIVO

En estudios de viabilidad de polen en maíz, por medio de germinación *in vitro*, Corazza *et al.*, (2016), usaron un medio constituido por 15% de sacarosa, 0.01% de ácido bórico, 0.025% de nitrato de calcio y agar al 0.6%, pH 6, con diferentes horas de recolección del polen y con una temperatura de incubación para el medio de 25 °C. Se obtuvo un porcentaje de germinación de 32%; esto correspondió a una recolección del polen de las 9:00 a.m. y el porcentaje más bajo fue de 9% de germinación recolectando a las 5:00 p.m.

De igual forma Cerovic *et al.*, (2014), Utilizaron la germinación *in vitro* para estudiar la viabilidad en híbridos de maíz, un medio constituido por 15% de sacarosa, 0.6% de bacto-agar, 0.03% de nitrato de calcio, 0.01% de ácido bórico y con temperaturas de incubación de entre 26-35°C. Registraron porcentajes de germinación más altos de 50.2% para el híbrido de ZPPL 201 y el resultado más bajo de 12.2% de germinación para el híbrido ZPPL 105.

Santos *et al.*, (1998), estudiaron la germinación de polen de maíz en un medio conformado por 0.45 M de sacarosa, 1.47 mM de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, 1.62 mM de H_3BO_3 y 0.6% de bacto-agar. Utilizaron polen tanto del control como el irradiado UV-B, bajo dos condiciones de luz diferentes, una PAR y otra Luz UV-B PAR plus (Radiación fotosintética activa). Donde se encontró como resultado, el mayor porcentaje de germinación con un 20.3% del polen de plantas tratadas bajo luz UV-B PAR, y el menor resultado de 17.4% cuando la germinación se realizó bajo radiación luz UV-B PAR plus.

Pfahler (1981), utilizó un medio de germinación de polen *in vitro* para maíz constituido por 15% de sacarosa, 0.6% de bacto-agar, 0.03% de nitrato de calcio y 0.01% de ácido bórico, pero en combinación de este medio con tres niveles de radiación UVB, el nivel 1($1688\text{nW}\cdot\text{m}^{-2}$), nivel 2($3278\text{nW}\cdot\text{m}^{-2}$) y el control (nivel 0= $0\text{nW}\cdot\text{m}^{-2}$) y periodos de almacenaje de 5 días a 2 °C, evaluaron el porcentaje de germinación con los días de almacenado. La investigación arrojó como resultado que al día 1 de almacenamiento el porcentaje de germinación expresado por la

longitud del tubo polínico fue estadísticamente superior con respecto a los días 2 al 5to. Después de 4 días de almacenamiento, no hubo germinación de polen *in vitro*. Los porcentajes de germinación fueron 46, 48, y 43 en los niveles 0, 1, y 2 de radiación UVB respectivamente. Los porcentajes de granos quebrados o rotos, fueron 4, 4 y 3 en los niveles 0, 1 y 2, respectivamente. Para ambos caracteres, estas diferencias entre los niveles eran relativamente pequeñas, aunque estadísticamente significativa. La radiación demuestra alguna alteración en la longitud del tubo polínico, a la segunda y tercera hora de ser expuestos a la radiación, de los niveles 1 y 2 con respecto al control nivel cero, lo que indica que existe diferencias significativas en estos, y la radiación UVB, provoca una disminución de la longitud del tubo polínico de los genotipos evaluados.

De acuerdo con Almeida *et al.*, (2011), quienes utilizaron medios de germinación *in vitro* para estudiar la viabilidad de polen en maíz, a diferentes concentraciones de agar, sacarosa, ácido bórico y cloruro de calcio (Cuadro 1), encontraron porcentajes de germinación superiores al 70%, para los medios 4, 5, y 6 y en contraste, porcentaje de germinación más bajo para el medio 1, alrededor del 20%, para los medios, 2 y 3, los porcentajes de germinación fueron de 58% y 50% respectivamente (Figura 1).

Cuadro 1: Composición química de los medios de cultivo para la germinación *in vitro* de polen de maíz (Almeida *et al.*, 2011)

Meio de cultura	Ágar (%)	Sacarose (%)	Ácido bórico (%)	Cloreto de cálcio (%)
M1	—	25	—	—
M2	—	10	0,04	—
M3	—	20	—	0,15
M4	1,0	15	0,03	—
M5	—	10	0,03	0,15
M6	0,7	17	0,01	0,03

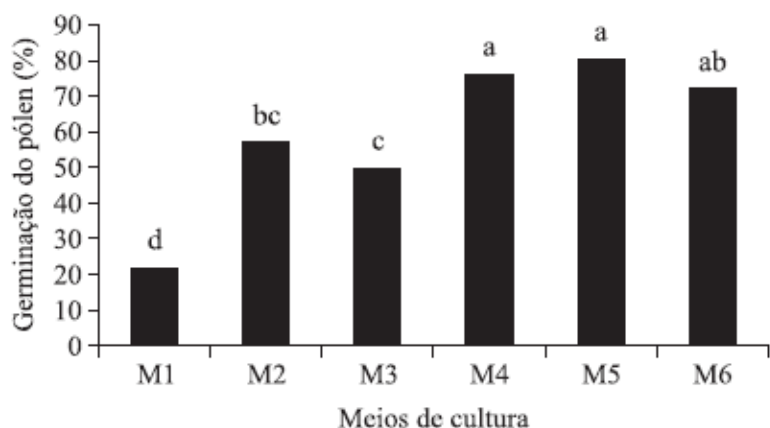


Figura 1. Germinación *in vitro* de polen de maíz (Almeida *et al.*, 2011)

En contraste Van y Bravo (1974), en estudios de viabilidad de polen por medio de tinción con solución de lugol ($I_2 + IK$), obtuvieron porcentajes de viabilidad superiores de, 90% con esta técnica, para los diferentes variedades e híbridos de maíz evaluados.

3.2. MEDIOS DE CULTIVO EMPLEADOS EN OTRAS PLANTAS DIFERENTES A MAÍZ

Araméndiz *et al.*, (2012), obtienen porcentajes de germinación de polen entre 46% y 79% en berenjena, utilizando el medio de cultivo propuesto por Reddy y Kakani (2007), constituido por 100 g de sacarosa, 500mg de nitrato de calcio, 120 mg de sulfato de magnesio, 100mg de nitrato de potasio y 120 mg de ácido bórico disueltos en 1000ml de agua destilada, 10 g de agar y pH ajustado a 6,0. Araméndiz *et al.*, (2013), encontraron que se incrementó la longitud del grano por cada hora de incubación a 25 °C.

Andres *et al.*, (1999), encontraron porcentajes superiores al 20% de viabilidad en clones albaricoquero en un medio de germinación *in vitro*, constituido con sacarosa al 15%, agar al 1% diluidos en agua destilada.

Vieira *et al.*, (2009), en estudios de viabilidad de polen en berenjena utilizaron el medio de cultivo propuesto Brewbaker y Kwack (1963), que consistió de $\text{KNO}_3(100\text{gL}^{-1})$, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}(200\text{gL}^{-1})$ y $\text{H}_3\text{BO}_3(100\text{gL}^{-1})$ y $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}(300\text{gL}^{-1})$, en diferentes concentraciones de sacarosa (Figura 2), mostrando el mejor resultado a 7.5 gL^{-1} de sacarosa con un 10.8% de granos de polen germinados. En el mismo estudio pero con test de germinación *in vivo*, después de 24 horas, se obtuvo un promedio de 66% de granos de polen germinados, resultando esta metodología válida para la evaluación polínica de berenjena.

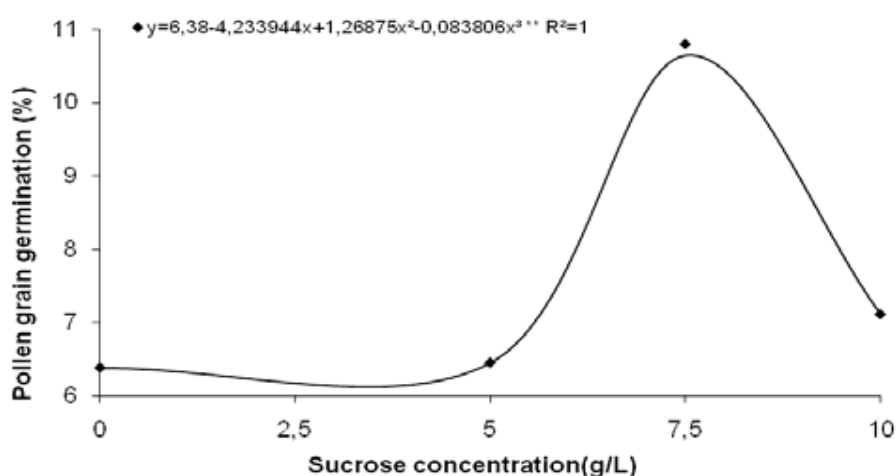


Figura 2. Porcentaje de germinación *in vitro* de granos de polen del cultivar Cica de berenjena sometido al medio de cultivo de Brewbaker y Kwack con diferentes concentraciones de sacarosa (Vieira *et al.*, 2009)

Garduño *et al.*, (2011), proponen que el medio de cultivo óptimo para sorgo está compuesto por 0.7 M sacarosa, $1.22 \mu\text{M}$ ácido bórico, $3.81 \mu\text{M}$ nitrato de calcio y 1% de agar en el cual encontraron 50% de formación de tubos polínicos mejor estructurados.

De acuerdo con Marini *et al.*, (2010), reportan que los mejor resultados se consiguieron con medio de cultivo constituido por 10 g de sacarosa, 0.0432 g de NO_3Ca y 0.003 g de ácido bórico, con un promedio de 28.69% de granos de polen germinados, en poblaciones de *Cucurbita máxima*.

Gonzales *et al.*, (2002), en estudios de viabilidad de polen en 9 especies de papa, con medio de cultivo compuesto por sacarosa 12%, 300 ppm de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, 200 ppm de MgSO_4 , 100 ppm de KNO_3 , 100 ppm de ácido bórico H_3BO_3 , a pH=6. Los porcentajes de germinación de polen fueron superior al 73% al día uno de conservado a 17 °C de temperatura, disminuyó la viabilidad al 0% al día decimo de conservado.

Palma (2010), determinó la viabilidad del polen de 4 especies del genero *Berberis* L, empleó el medio señalado por Kearns e Inouye (1994), constituido por 20% de sacarosa, ácido bórico, nitrato de calcio, nitrato de potasio, sulfato de magnesio y agar, encontró como resultado 51.8% de germinación *in vitro* del polen.

Davarynejad *et al.*, (2008), estudiaron la viabilidad de polen de variedades de cereza, el medio de cultivo estuvo constituido por 0.5% de agar + 15% de sacarosa, 5 ppm de ácido bórico e incubado a temperatura constante de 25 °C. Encontraron como resultado la germinación del polen entre 64.5% y 28.8%.

Albuquerque *et al.*, (2007), en estudios de viabilidad de polen almacenado en 6 cultivares de cereza dulce, por la técnica de germinación *in vitro* en un medio de cultivo constituido por 15% sacarosa y 1.2% de bacto-agar y una temperatura de almacenaje de 4°C y -20°C del polen. El polen fue tomado a los 7 y 540 días de almacenado para la siembra en el medio de cultivo. Encontraron una disminución de la viabilidad después de 15 o 30 días de almacenado a 4°C, sin embargo el polen permaneció viable hasta un año cuando fue almacenado a -20°C.

Shekari *et al.*, (2016), en estudios de viabilidad de polen en *Leonurus cardiaca*, utilizaron un medio de cultivo de germinación *in vitro* constituido por 15% de sacarosa, 100 ppm de ácido bórico y 1% de agar; evaluaron la germinación un día antes de la antesis, 2, 24, 48 y 72 horas después de la antesis. Se encontró 82.84% de germinación a 2 horas después de la antesis, hasta reducirse 0.19% el porcentaje germinación a las 72 horas después de la antesis.

4. MARCO TEÓRICO CONCEPTUAL

4.1. LA PLANTA DE MAÍZ Y SU ESTRUCTURA FLORAL.

El maíz es una planta alógama, monoíca y con polinización típicamente anemófila. Presenta polinización cruzada favorecida por el viento y la gravedad que son los agentes que transportan el grano de polen de la espiga al estigma (Santoyo, 2004., Ortiz *et al.*, 2010 y Corcuera, 2012). Las flores son unisexuales, contienen, los estambres o el ovario, pero no ambos. Las inflorescencias masculinas están en ramas terminales y las inflorescencias femeninas más abajo, en las ramas laterales (figura 3) (Mackean, 2016).

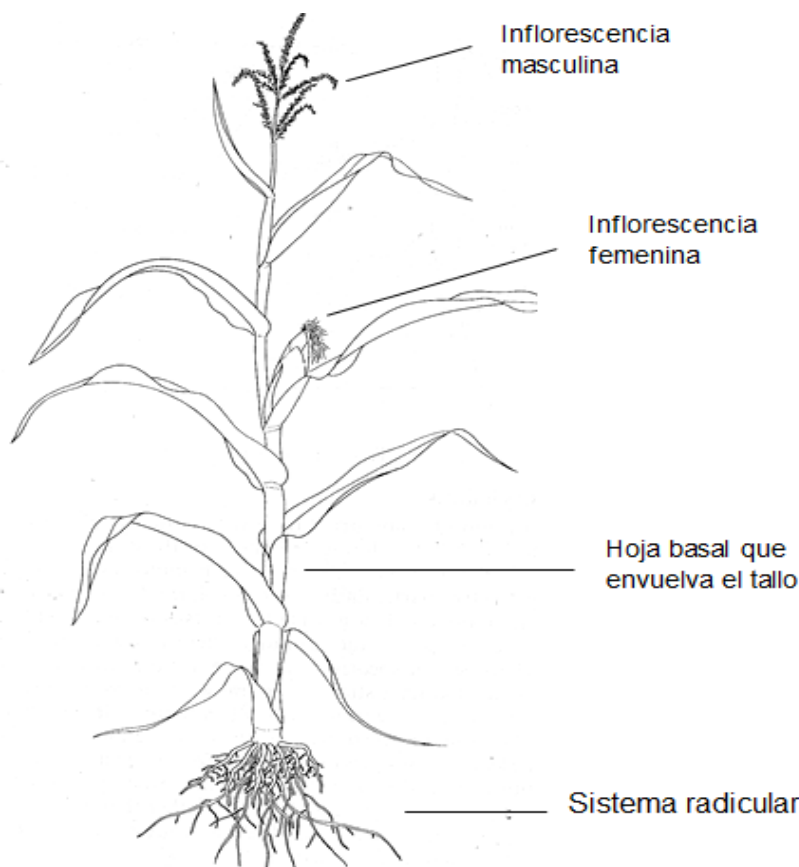


Figura 3. Esquema de la planta de maíz, donde muestra la distribución de las inflorescencias Masculinas y femeninas (Mackean, 2016).

4.1.1. Inflorescencia masculina

Consiste en un eje central largo y varias ramas laterales teniendo numerosas espiguillas estaminadas emparejadas (Hickey y King, 2007). Esta panoja se desarrolla en el punto de crecimiento apical en el extremo superior de la planta. Inicialmente, la inflorescencia masculina tiene primordios de flores bisexuales; durante el proceso de desarrollo los primordios de gineceos en la inflorescencia apical abortan y queda sólo la inflorescencia masculina, la cual se desarrolla desde un eje central que corresponde a una prolongación del tallo de la planta. En los dos tercios superiores de dicho eje se desarrolla una espiga, bajo la cual se originan varias ramificaciones finas de aspecto plumoso que corresponden a espigas laterales. Tanto en la espiga central como en las laterales se originan espiguillas, éstas siempre se producen en pares, siendo una pedicelada y la otra sésil (figura 4). Cada espiga puede llegar a tener hasta 30 o 40 espiguillas. En cada espiguilla hay dos antecios, más conocidos como florecillas, una de ellas se denomina flor superior debido a que su trío de anteras se encuentra en un estado de desarrollo más avanzado que el de la otra, la cual se denomina flor inferior (figura 5) (Almeida, 2009).

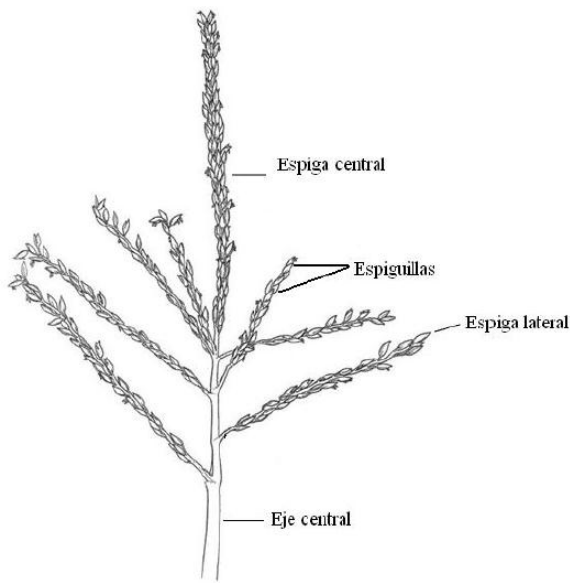


Figura 4. Estructura de la inflorescencia masculina del maíz con la distribución de sus espigas (Almeida, 2009).



Figura 5. Estructura de una espiguilla de maíz, cada espiguilla contiene una flor superior (derecha) y una inferior (izquierda), cada una de las cuales tiene tres anteras (Almeida, 2009).

Las anteras del maíz están compuestas por dos tecas, cada una de ellas está formada por dos sacos polínicos, los cuales a su vez están formados por una

pared y una cavidad que contiene a las microsporas. La pared de la antera está formada por cuatro capas que encierran a las microsporas: la epidermis, el endotecio, la lámina media y el tapet, (figura 6). El tapet es la capa adyacente a las microsporas y juega un rol muy importante en el desarrollo de las mismas. Se conocen varias funciones de las células del tapet, una de ellas es que juegan un papel fundamental en la nutrición de las microsporas, una segunda función es liberar microsporas jóvenes haploides de la pared dura que encierra a las tétradas, justo después de terminada la meiosis, la tercera función es la producción de precursores para la formación de la pared exterior del polen o exina. El desarrollo del polen se lleva a cabo dentro de las anteras (Bedinger, 1992).

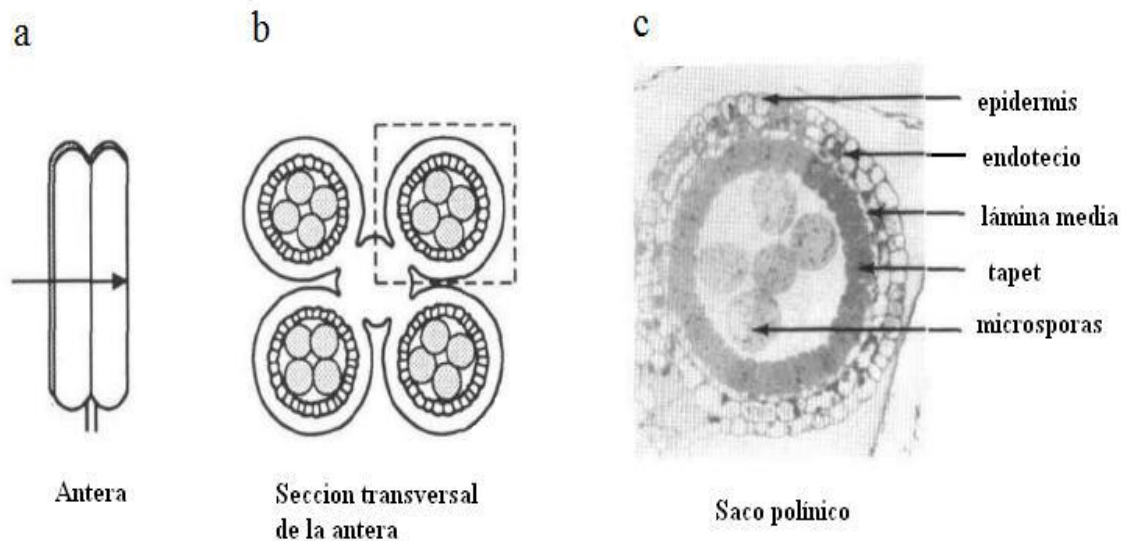


Figura 6. Estructura de la antera de maíz. (a) Diagrama de la antera. (b) Diagrama del corte transversal de la antera, el recuadro indica un saco polínico. (c) Saco polínico, identificando las diferentes capas de la pared de la antera (Bedinger, 1992 y Almeida, 2009).

4.1.2. Descripción del grano de polen

El polen se origina de la microsporogénesis, que es la división de los gametos masculinos, la cual se realiza en las anteras de los estambres que se encuentran

en las flores de la espiguilla, al final del tallo (Santoyo, 2004). Cada antera produce aproximadamente 2.500 granos de polen y una sola espiguilla unos 15.000, de esta manera una panoja produce entre 20 a 50 millones de granos de polen (Sturtevant, 1881). En el maíz dentado hay disponibles unos 45.000 granos de polen por cada óvulo (Lazenby, 1898). El grano de polen presenta una estructura trinuclear, tiene una célula vegetativa, dos gametas masculinas y numerosos granos de almidón. Su gruesa pared tiene dos capas, la exina y la intina las cuales son bastante resistentes, (Figura 7). A causa de las diferencias de desarrollo entre las florecillas superiores e inferiores en las espiguillas masculinas y la maduración asincrónica de las espigas, el polen cae continuamente de cada espiga por un período de una semana o más (Paliwal, 2001). Almeida (2009) y Garduño *et al.*, (2011), reportan que al ser trinucleado, su almacenamiento y manejo, se dificulta debido a que tiene una membrana muy fina y menos resistente, y posee mayor humedad que se puede perder muy fácilmente ocasionando deshidratación en un corto periodo de tiempo. Además tiene una tasa de actividad metabólica de dos a tres veces mayor que la del polen binucleado (Garduño *et al.*, 2011).

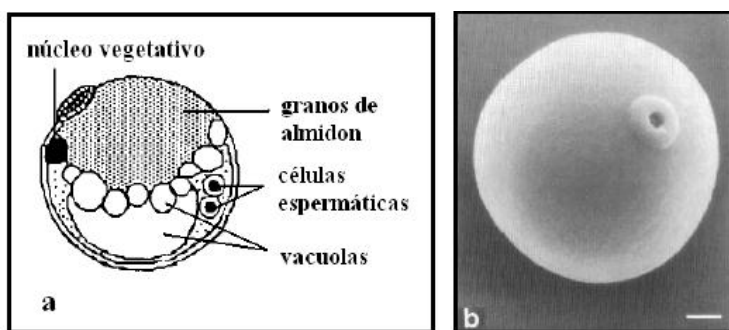


Figura 7. (a) Estructura interna de una microspora de maíz. (b) Grano de polen de maíz, donde se aprecia su forma esférica y el poro (Almeida, 2009).

4.1.3. Inflorescencia femenina

Es una espiga modificada que se desarrolla a partir de una yema ubicada en la axila de las hojas más grandes (Hickey y King, 2007 y Corcuera, 2012). Generalmente se forma en la 6ta a 8va hoja y constituye la terminación de una

ramificación lateral corta. En algunas plantas pueden desarrollarse 2 yemas reproductivas o más raramente 3 desde arriba hacia abajo. La espiga consiste en un eje central o raquis engrosado sobre el que se alojan pares de espiguillas pistiladas sésiles y bifloras dispuestas en hileras longitudinales (Corcuera, 2012). Está envuelta en hojas que forma la mazorca. Las espiguillas están dispuestas en espiral en el tallo de la inflorescencia. Cada flor está encerrada por brácteas delgadas transparentes. La flor consta de un ovario con un óvulo, y un estilo largo (figura 8) (Mackean, 2016). El ovario es la porción basal del pistilo, abultada y ensanchada que corresponderá al fruto. Está constituido por los carpelos o paredes u hojas carpelares, que se unen formándolo y produciendo en su interior los rudimentos seminales, futuras semillas (Jaramillo, 2006). Los óvulos son el resultado de la macrosporogénesis, localizada en las flores pistiladas, aproximadamente a la mitad del tallo (Santoyo, 2004).

Los estigmas son la prolongación del estilo de los óvulos maduros en la mazorca. Los estambres crecen hasta 30 centímetros o más para llegar al extremo de las hojas de cobertura o espatas. Los estambres están cubiertos por numerosos pelos o tricomas colocados en ángulo abierto con el estambre, donde serán retenidos los granos de polen. El desarrollo de las flores femeninas y de los óvulos en la mazorca es acropétalo, es decir, desde la base hacia arriba (Paliwal, 2001). Sin embargo, y debido probablemente a la fertilización más temprana, el desarrollo del grano comienza a cinco centímetros por encima de la base de la mazorca. El desarrollo de los estambres continúa por varios días y los estambres receptivos aparecen en tres a cuatro días; permanecen receptivos y continúan creciendo por varios días más después de su emergencia por encima de las hojas de cobertura hasta que son polinizados (Paliwal, 2001).

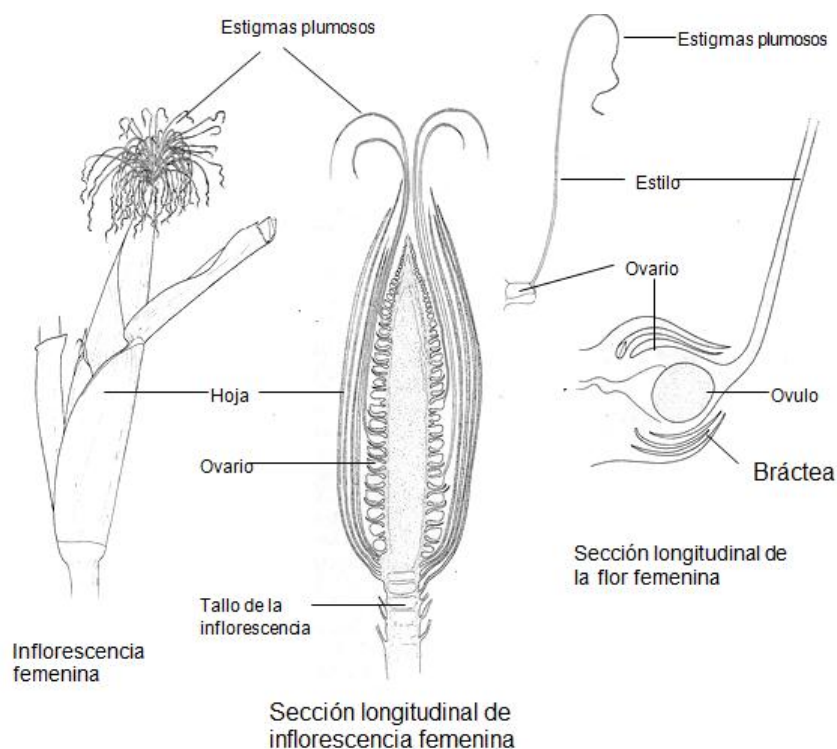


Figura 8. Esquema de la estructura femenina de la flor del maíz con sus partes (Mackean, 2016).

4.1.4. Polinización y fertilización

Este proceso en el maíz tropical ocurre durante los días más cálidos del período de crecimiento. A causa de la variabilidad del tiempo en la temporada lluviosa en los trópicos, la duración del período de polinización es mayor que bajo condiciones de irrigación pero el tiempo cálido y húmedo no afecta negativamente ni la polinización ni la fertilización. Sin embargo, el tiempo cálido y seco afecta adversamente a los estambres los cuales se secan fácilmente dañando el crecimiento del tubo polínico y la fertilización. Los estambres receptivos son húmedos y pegajosos y el grano de polen germina inmediatamente después de alojarse en los estambres. El largo tubo polínico necesita 24 horas para recorrer todo el estambre y alcanzar el óvulo para fertilizarlo (Paliwal, 2001).

Según Santoyo (2004), en el proceso de polinización en maíz el desprendimiento del polen puede durar varios días y su viabilidad entre 18 y 24 horas, en condiciones ambientales favorables. Por su parte Coe *et al.*, (1988), determina que el polen liberado al viento usualmente es viable de 10 a 30 minutos, pero bajo determinados ambientes favorables mantiene su viabilidad hasta 24 horas. La fertilización se da con la caída del polen sobre los estigmas, a partir de entonces, germina una nueva célula en el tubo polínico, el cual transporta dos núcleos generativos que harán una doble fertilización en el óvulo para producir un grano de maíz; esto sucederá con todos los óvulos de la mazorca, llenando de nuevos individuos, en condiciones normales (Santoyo, 2004).

El desprendimiento del polen se inicia en el medio de la rama principal de la espiga, que se extiende a las ramas laterales. Una espiga individual puede arrojar polen durante 2 a 10 días, dependiendo del genotipo y las condiciones ambientales (Cerovic *et al.*, 2014). Asimismo de acuerdo a lo anterior Corcuera (2012), establece que una panoja, puede producir polen durante varios días. Las variedades criollas liberaban polen durante unos 14 días. Sin embargo, los modernos genotipos híbridos distribuyen polen de 2 a 4 días. En condiciones favorables, el polen comienza a ser liberado cuando sale el sol y finaliza hacia el atardecer, pero la mayor liberación se produce entre las 10 y 15 horas. En un día calmado, el polen cae desde la panoja y se distribuye sobre un radio de aproximadamente 1m. En cambio, en un día con vientos el polen puede ser llevado a cientos de metros de distancia.

4.2. VIABILIDAD POLINÍCA

Se define como la capacidad del grano de polen para germinar, crecer y fertilizar (Palma, 2010 y Rejón *et al.*, 2010). Esta condición es muy útil en las tecnologías aplicadas a la agricultura, como lo son la realización de experimentos de reproducción, y en el análisis de condiciones de almacenaje del polen a través del tiempo (Palma, 2010).

Según Dafni y Firmage (2000), describen el término viabilidad como la capacidad de los granos de polen para germinar en el estigma. Kearns e Inouye, (1994) y Almeida (2011) dicen que la viabilidad polínica es una medida de la fertilidad masculina, la habilidad que posee el polen para cumplir su función en el proceso de fecundación. Este conocimiento es uno de los aspectos a estudiar para lograr una eficiente reproducción sexual (Orillo y Bornierbale, 2009).

4.3. FACTORES QUE AFECTAN LA VIABILIDAD POLÍNICA

La fertilidad o viabilidad del grano de polen no solo depende de factores ambientales como, humedad, temperatura, composición de la atmósfera y presión parcial de oxígeno, sino que también se ve afectada por factores genéticos como morfología del polen, tamaño, porcentaje y tasa de germinación, el crecimiento, la viabilidad y la capacidad de competencia germinativa (Sánchez y Romero, 2013). De igual forma se puede ver influenciada por factores intrínsecos, como estado fisiológico de maduración y nutrición de la planta y por factores extrínsecos como composición del medio de cultivo, la densidad del polen en el medio, la temperatura y el tiempo de incubación y periodo de recolección (Corazza *et al.*, 2016).

Por su parte Kearns e Inouye (1994), determinaron que la viabilidad polínica es máxima al momento de la dehiscencia de la antera, disminuyendo rápidamente a través del tiempo. Por lo cual afirman que existen diversos factores que influyen los cuales se manifiestan al momento de la colecta y en el posterior almacenaje del polen. Por ejemplo se puede indicar entre estos factores, la hora del día en la cual se colecta el polen y el estado de desarrollo floral de donde proviene, así como también la temperatura y humedad relativa del medio, en que se conservará el material polínico.

De acuerdo a lo anterior Albuquerque *et al.*, (2007), proponen que la viabilidad polínica decrece rápidamente de acuerdo a condiciones de almacenaje, entre ellas la temperatura, donde esta disminuye a la mitad luego de someter el polen a 24° C por cuatro horas o una hora a 27.7° C. Por ende el estrés por temperatura alta en

el momento de la antesis podría tener consecuencias sobre la espiga y polen, en términos de una gran reducción de su viabilidad (Cerovic *et al.*, 2014).

Según Kearns y Inouye (1994), la recolección cuidadosa de muestras de polen es un aspecto importante de muchos estudios de polinización. La cantidad de polen recolectado depende de la especie, el genotipo, la estación, la temperatura, la humedad, la hora del día y la luz (Hernández, 2010).

Diversos autores sugieren que el polen de maíz permanece viable entre una y dos horas. La mejor etapa para colectarlo es justo después de la antesis, por lo tanto se requiere de la revisión constante de las espigas para colectar el polen en el momento adecuado y tener éxito en la germinación sobre los medios de cultivo (Luna *et al.*, 2001, citado por Rodríguez, 2004 y Garduño *et al.*, 2011).

Corazza *et al.*, (2016), reportan que el grano de polen de maíz cuando se expone a la deshidratación por las condiciones ambientales, puede perder sustancialmente toda la viabilidad en tres horas, medida por la germinación *in vitro* del grano de polen. Además que la viabilidad depende de la humedad durante el experimento, es decir, con 20% o menos de humedad relativa, se pierda toda la viabilidad en 50 minutos, mientras que con el 75% de humedad relativa del polen todavía presenta viabilidad después de cuatro horas. Además plantea que para recolectar polen de maíz la temperatura debe estar alrededor de los 27,2°C y la humedad relativa en un 72%, para obtener una considerable germinación del polen *in vitro*. Según Rodríguez (2004), el polen de maíz una vez que se encuentra deshidratado, es difícil conseguir la germinación en medio de cultivo.

En sorgo las condiciones óptimas para colectar polen son justo después de la antesis, en un ambiente con una humedad relativa superior a 70 % entre 23 y 25 °C de temperatura (Garduño *et al.*, 2011).

Dafni y Firmage (2000), agregan que la pérdida de viabilidad es un proceso continuo, en donde se involucran una serie de enzimas que son degradadas progresivamente y a diferentes ritmos. Afirman también, que las causas de esta

pérdida de viabilidad son morfológicas, ambientales y por factores internos, que son propios de cada individuo. Entre los factores que afectan la viabilidad del polen destacan la edad, metabolismo, número y funcionalidad de los núcleos, la protección y exposición dentro de las anteras, la humedad relativa y temperatura al momento de la dispersión.

Palma (2010), señala que un polen viable puede no germinar en el estigma producto de varios factores, como que éste último no se encuentre receptivo al momento de la polinización, a causa de condiciones medioambientales como altas temperaturas, baja humedad, vientos fuertes, secos y fríos. Agrega también que otra causa de baja viabilidad del polen es la incompatibilidad de las variedades polinizadoras con las que se quiere polinizar, en esta situación el polen germina normalmente, pero el tubo polínico detiene el crecimiento a mitad de su recorrido y no se efectúa la fecundación. Por último, añade que la causa más común para la baja germinación del polen, es cuando la calidad de este se ve afectada, debido a que fue colectado, almacenado y transportado de forma inadecuada, así como también cuando el polen es demasiado viejo, todas estas razones dan como resultado una baja viabilidad y con ello, una inapropiada fructificación.

4.4. MÉTODOS DE DETERMINACIÓN DE LA VIABILIDAD DEL POLEN

La viabilidad del polen puede ser medida, a través de diferentes técnicas o métodos. Estas pueden ser *in vitro* e *in vivo* (Rejón *et al.*, 2010; Araméndiz *et al.*, 2013 y Alcaraz, 2009). Los cuales miden el porcentaje de germinación, crecimiento y estimación del grado de fertilidad del grano de polen (Hernández, 2010). El método más eficiente consiste en analizar el porcentaje de cuajado obtenido tras polinizar con los genotipos de estudio (Alcaraz, 2009).

Las pruebas de viabilidad se pueden clasificar en tres categorías, las cuales son pruebas de germinación, pruebas de metabolismo polínico y las tinciones tradicionales. Entre las pruebas de germinación encontramos la germinación *in vivo*, *in vitro* y *semi vivo*, en las pruebas de metabolismo polínico están los ensayos de actividad enzimática y en tinciones tradicionales se encuentran

aquellas técnicas que indican la presencia de citoplasma en el grano de polen (Palma, 2010).

4.4.1. Germinación *in vitro*

Se debe determinar el poder germinativo del polen para utilizar el recurso eficazmente. Para ello es necesario aplicar métodos adecuados para determinar su habilidad para fertilizar los óvulos. Existen diferentes técnicas de germinación *in vitro* que son consideradas como las más exactas, ya que permiten contabilizar la cantidad de polen germinado, a diferencia de las técnicas de tinción, en las que se pueden teñir granos de polen muertos mostrándolos como viables (Marini *et al.*, 2010).

Existen numerosos estudios para determinar un medio de cultivo artificial apropiado para medir en forma simple y confiable la germinabilidad del polen de algunas plantas. Hay estudios específicos con polen de especies, variedades y clones de una misma especie. Las investigaciones orientadas a obtener un medio de germinación apropiada para el polen de una planta cualquiera, tienen diversas finalidades: determinar la capacidad germinativa de una muestra de polen conservada de una estación a otra, de una muestra de polen para hibridar una variedad que florece más tarde, estudiar problemas de esterilidad, partenocarpia, efecto de sustancias reguladoras de crecimiento, etc. (Varas, 1961).

La técnica de germinación *in vitro*, implica inducir la formación del tubo polínico en un medio artificial, lo cual es un indicio de viabilidad ya que revela el estado de las membranas, núcleos y la tasa de conversión de las reservas (Dafni y Firmage, 2000). La germinación de polen *in vitro* en el maíz representa una compleja interacción entre la morfología y fisiología del grano de polen y los componentes del medio (Pfahler, 1981). Se ha demostrado por experimentación que los requerimientos nutritivos del substrato germinativo no son iguales para todas las plantas (Varas, 1961).

De acuerdo a lo anterior Pfahler (1981), plantea que en estudios iniciales de germinación *in vitro* de polen de maíz, el medio sugerido fue desarrollado usando granos de polen de un solo genotipo y el medio era una solución acuosa, semisólida que solo tenía sacarosa y bacto-agar. Sin embargo se pudo demostrar que con un solo genotipo como fuente de polen, al adicionar nitrato de calcio y ácido bórico a este medio se podía aumentar el porcentaje de germinación y el crecimiento del polen. En estudios más recientes utilizando polen de varios genotipos de maíz, se evidencio una interacción significativa entre las fuentes del polen y diversas combinaciones de ácido bórico-nitrato de calcio, se hizo presente tanto para el porcentaje de germinación y el crecimiento del tubo polínico, de esta manera se demuestra que la estructura y fisiología del grano de polen es controlado genéticamente y la composición del medio es crítica para la germinación y el crecimiento del tubo polínico.

La determinación de la germinación del polen *in vitro* se considera un método confiable de la fertilidad, que se define por la elongación del tubo polínico en un medio adecuado (Van Marrewijk, 1993; citado Ordoñez y Bonierbale, 2015), ya que los métodos de tinción tienden a sobreestimar la viabilidad. Así, la germinación o cultivo de polen *in vitro*, simula el desarrollo del tubo polínico en los tejidos estilares, ya que el medio de cultivo utilizado semeja en su composición al mucílago del estigma (Ordoñez, 2014 y Almeida *et al.*, 2011). Sin embargo la germinación *in vitro* tiende a sobrestimar la fertilización *in vivo*, ya que no tiene en cuenta la influencia de los factores importantes como la receptividad del estigma, barreras, e influencia genética y ambiental (Almeida *et al.*, 2011). De igual forma Araméndiz *et al.*, (2012), consideran este método fiable y no destructivo para determinar el porcentaje de germinación y el crecimiento del tubo polínico. De acuerdo a lo anterior Alcaraz, (2009), propone como el mejor método para el estudio de la viabilidad del polen debido a su simplicidad y a que permite cuantificarla.

Por otro lado, hay que tener en cuenta que los factores óptimos de la germinación en un medio *in vitro* nunca van a ser iguales a los de la germinación en el pistilo y

por tanto el porcentaje que se obtenga siempre será diferente al que en realidad se tiene en la flor *in situ* (Rejón *et al.*, 2010).

Los medios de cultivos en condición líquida y sólida, enriquecidos con sacarosa, calcio o boro son componentes de importancia para la germinación. Además, ensayos a diferentes concentraciones de estos nutrientes permiten abordar con mayor propiedad pruebas de viabilidad (Marini *et al.*, 2010).

5. JUSTIFICACIÓN

Al estudiar la calidad del polen, se puede obtener resultados confiables para la utilización en los Programas de Cruzamiento Genético y en la producción de frutos y semilla. Diversos autores proponen determinar la viabilidad de polen, por medio de la germinación *in vitro*, es considerada confiable, exacta y simple (Van Marrewijk, 1993., citado Ordoñez y Bonierbale, 2015., Alcaraz, 2009., Marini *et al.*, 2010 y Araméndiz *et al.*, 2012).

Según Vieira *et al.*, (2009) y Palma (2010), la técnica de germinación *in vitro* presenta ventajas frente a las tinciones tradicionales y los ensayos de actividad enzimática, debido a que estas dos últimas pueden arrojar falsos positivos de viabilidad, al detectar elementos celulares y enzimas funcionales, los cuales no garantizan que el polen sea viable.

Según Pfahler (1967), afirma que se han desarrollado medios y procedimientos para la germinación de polen *in vitro* en numerosas especies. Sin embargo, la germinación artificial de polen dentro de las especies de gramíneas ha resultado laborioso; el polen de maíz presenta estructura trinuclear, lo cual lo hace de difícil manejo y almacenamiento (Almeida, 2009 y Garduño *et al.*, 2011).

Según lo anterior, es necesario identificar los componentes y cantidades del medio de cultivo para germinar granos polen de maíz. Alcanzar los máximos valores de germinación que reflejen la viabilidad real en campo y así ser más eficientes en la producción de semilla.

6. OBJETIVOS

6.1. OBJETIVO GENERAL

- Evaluar diferentes medios de cultivo sobre la germinación *in vitro* de granos de polen de *Zea mays* del híbrido Synko crecido en el Centro de Desarrollo Agrícola y Forestal de la Universidad del Magdalena (C.D.A.F).

6.2. OBJETIVO ESPECÍFICO

- Recolectar polen viable de *Zea mays* del híbrido Synko crecido en el Centro de Desarrollo Agrícola y Forestal de la Universidad del Magdalena (C.D.A.F).
- Determinar el efecto de distintas formulaciones de medios de cultivo *in vitro* sobre la germinación de granos de polen de *Zea mays* del híbrido Synko.
- Evaluar la germinación *in vitro de polen de Zea mays* del híbrido Synko

7. DISEÑO METODOLÓGICO

Determinación del efecto de distintas formulaciones de medios de cultivo *in vitro* sobre la germinación de granos de polen de *Zea mays* del híbrido Synko.

7.1. UBICACIÓN, SIEMBRA Y DESARROLLO DEL CULTIVO.

Se sembró el híbrido Synko dentro de las instalaciones de la Universidad del Magdalena, en el Centro de Desarrollo Agrícola y Forestal de la Universidad del Magdalena (C.D.A.F), ubicado en la ciudad de Santa Marta, en el departamento del Magdalena (Colombia), localizada geográficamente, 74° 07' y 74° 12' de longitud Oeste 11° 11' 0.9" y 11° 13' 29.6" de latitud Norte. Se realizó dos siembras consecutivas, con diferencias entre ellas de 15 días, hasta cubrir un área de 70m x 11m con distancias entre surco de 0.8m y entre planta de 0.50m (figura 9).

El suelo se preparó con un pase de rastrilla y uno de arado, se fertilizó con una mezcla de 17-6-18-2 (nitrógeno, fósforo, potasio y magnesio) en una dosis de 35 gramos/planta, antes de la floración del cultivo. Se realizó un control de malezas 15 días después de la siembra, enmarcado en un plateo manual y con guadaña entre los surcos hasta desmalezar toda el área requerida (figura10). Para el control de larvas de lepidóptera, se realizaron dos aplicaciones, entre los 15-20 días después de la siembra con 80 gramos de *Bacillus thuringiensis* y 24 cc de Carrier diluidos en una bomba de espalda con capacidad de 20 litros, la mezcla se aplicó entre 6:00 y 7:00 am, se realizó un mojado completo del cogollo de la planta por hileras hasta cubrir el lote, luego se realizó una segunda aplicación 8 días después. Lo anterior con el fin de no inactivar el producto por los rayos solares y coincidir con la hora de ingestión de las larvas.



Figura 9. Estaqueado del lote para siembra del maíz híbrido Synko.

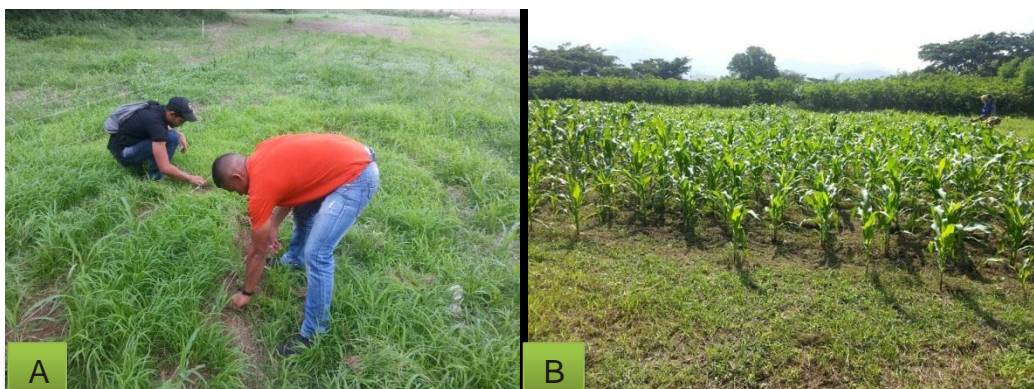


Figura 10. Control de malezas en lote de maíz híbrido Synko. A, plateo. B, Control con Guadaña.

7.2. RECOLECCIÓN DEL POLEN.

La recolecta del polen se realizó dos veces en el tiempo correspondiendo a cada una de las siembras; el polen se recolectó a las 6:00 am durante la antesis de las flores masculinas; se registró la humedad relativa y la temperatura ambiental con un higrotermómetro digital modelo L101. La recolecta se realizó en una bolsas especiales para almacenar polen, son de papel blanco recubiertas con cera, la espiga se ubicó dentro de la bolsa, y por medio de golpes suaves, se dio el desprendimiento del polen dentro de ella, se tomó polen de 10 a 12 espigas, luego

se transportó de inmediato al laboratorio para así evitar su deshidratación. Una vez el polen se trasladó al laboratorio se depositó en una caja de Petri para la eliminación de impurezas y realizar las respectivas siembras en los medios de cultivo.

7.3. EVALUACIÓN DEL POLEN DE MAÍZ EN MEDIOS DE CULTIVO *IN VITRO*.

La constitución de los medios de cultivo fue una combinación de diferentes concentraciones de Agar-Agar al 0.6, 0.7 y 1%, Sacarosa al 10, 15, 17, 20 y 25%, Ácido Bórico al 0, 0.01, 0.03 y 0.04% y Nitrato de Calcio al 0, 0.025, 0.01 y 0.03) (Cuadro 2). Se aplicó un diseño completamente al azar con cinco tratamientos, con dos replicas en el tiempo. Cada replica se conformó por ocho cajas Petri donde se realizaron cuatro conteos por caja sobre 50 granos de polen cada uno.

Los componentes del medio de cultivo se adicionaron y calentaron evitando la ebullición de la mezcla, hasta alcanzar una completa disolución de cada uno de los componentes de acuerdo a los tratamientos correspondientes. En la autoclave se esterilizaron los medios y cajas de Petri, ambos envueltos en papel kraft. Posteriormente se sirvieron los medios en las cajas de Petri cuando la temperatura de estos se pudo tolerar al tacto, en la cámara de flujo laminar y bajo condiciones de asepsia. El pH se ajustó a 6, con ácido nítrico 0.1 N o hidróxido de sodio a 0.1 N, en caso de ser requerido. Los medios de germinación se prepararon con un día de anticipación a la siembra del polen, se sirvieron, marcaron e identificaron las cajas Petri de acuerdo a los tratamientos correspondientes. Se dejaron en el cuarto de incubación para su posterior siembra.

Cuadro 2: Descripción de cinco medios de germinación de polen de maíz del híbrido Synko, con las respectivas concentraciones de Agar-Agar, sacarosa, ácido bórico y nitrato de calcio en porcentajes (Bair y Loomis, 1941., citado por Varas, 1961., Pfahler, 1981., Almeida *et al.*, 2011., Cerovic *et al.*, 2014 y Corazza *et al.*, 2016).

Tratamiento	Agar-Agar (%)	Sacarosa (%)	Ácido bórico (%)	Nitrato de calcio (%)
1	1	10	0.03	0.025
2	1	20	0.04	0
3	0.7	15	0.01	0.01
4	0.6	17	0	0.03
5	0.6	25	0	0

La siembra del polen en las cajas Petri, se hizo con una aguja de disección, se distribuyó el polen en cuatro campos, luego se selló con papel parafilm y las cajas de Petri se colocó por dos horas a una temperatura entre 25-27°C (Almeida *et al.*, 2011 y Corazza *et al.*, 2016) (figura 11). El porcentaje de granos de polen germinados se calculó por el cociente del número de granos de polen germinados en cada campo óptico con relación al total de 50 granos de polen en el mismo campo (Araméndiz *et al.*, 2012., Cerovic *et al.*, 2014 y Corazza *et al.*, 2016).

$$\% \text{ viabilidad} = \frac{\text{No. granos de polen germinados}}{\text{No. granos de polen totales}} \times 100$$

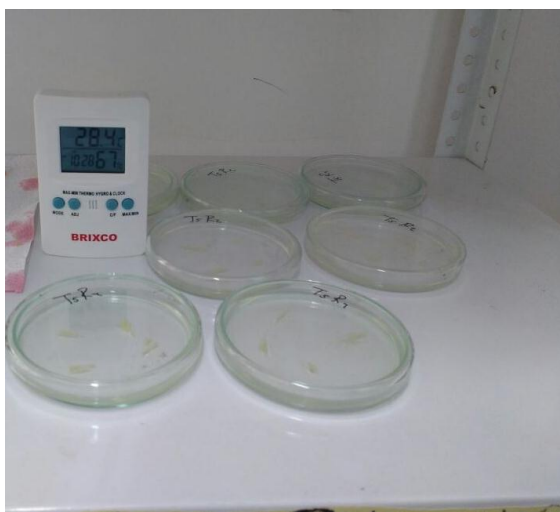


Figura 11. Granos de polen de maíz en medios de cultivo *in vitro* incubados en cuarto de incubación por dos horas.

El conteo se realizó con la ayuda del estéreo-microscopio Leica M205 y el microscopio compuesto de luz. Como testigo de viabilidad de polen se utilizó la prueba de tinción, en la cual se tomó polen recién colectado se pasó a 10 portaobjetos y se les añadió una gota de acetocarmin.

Después de 24 horas se observó el polen en el estéreo-microscopio LEICA M205; para su evaluación se trazó campos que ayudaron en a realizar el conteo. Se realizó una determinación visual basada en la forma, los granos de polen redondeados y colorados de rojo se consideró viables y los constreñidos y sin teñir se clasificó como no viables.

Se estimó el % de viabilidad, dato que sirvió de parámetro de comparación a la viabilidad conseguida por el método de germinación *in vitro*

$$\%viabilidad = \frac{N^{\circ} \text{ de granos bien formados y teñidos}}{N^{\circ} \text{ total de granos}} * 100$$

Para determinar el efecto entre los tratamientos se realizó un análisis de varianza. En los tratamientos que reportaron diferencias, se hizo una comparación de medias por medio de la prueba de rangos múltiples Duncan a 5% de significancia estadística, para comparar cada uno de los medios y sus componentes, y saber cuál favoreció la germinación de los granos de polen. Para el análisis se utilizó el programa estadístico Statgraphics Centurion XVI.I.

8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Determinación del efecto de distintas formulaciones de medios de cultivo *in vitro* sobre la germinación de granos de polen de *Zea mays* del híbrido Synko.

8.1. SIEMBRA Y DESARROLLO DEL CULTIVO.

La germinación del híbrido Synko se dio en promedio a los 7 días después de la siembra. La precipitación acumulada en la zona durante el ciclo del cultivo, desde la siembra hasta la recolección de polen, fue de 267.4 mm (IDEAM, 2016), con suministro de riego a capacidad de campo. Según lo anterior Bonilla (2009), establece que la condición ideal de humedad del suelo, para el desarrollo del maíz, es el estado de capacidad de campo. Durante la temporada de crecimiento la cantidad de agua no debe ser menor de 300mm. La precipitación óptima debe estar entre 550 y 1000mm. Además la cantidad, distribución y eficiencia de la lluvia son factores importantes en la producción de maíz. El calor y la sequía durante el periodo de polinización, a menudo causan desecación del tejido foliar y la formación deficiente del grano.

La temperatura promedio desde la siembra hasta la etapa de recolección del polen en el cultivo estuvo alrededor de 28.5°C y la humedad relativa 76 % (IDEAM, 2016). Respecto a lo anterior Bonilla (2009), propone que la temperatura óptima para el crecimiento y reproducción de la planta debe estar entre 20-30°C. La temperatura y la humedad relativa del aire están relacionadas entre sí en cualquier lugar, la coincidencia de estos dos factores influyen el periodo de la madurez del grano.

El control de malezas se inició a los 15 días después de sembrado el cultivo, realizando dos controles, con un periodo entre ellos de quince días, durante el ciclo del cultivo hasta la recolección del polen. En relación a lo anterior Bonilla (2009), establece que el periodo en que las malezas causan más daño en el

cultivo de maíz es, entre los 15 y 45 días después de la siembra, posterior a este periodo el maíz se cuida solo.

La plaga de mayor importancia que se presentó en el cultivo fue, el gusano cogollero. El cual fue severo durante las primeras etapas del cultivo, hasta los 30 días después de siembra. Posteriormente se evidenció una disminución del ataque antes de la floración, donde empezó el periodo de recuperación y compensación del cultivo. De igual forma Jaramillo *et al.*, (1989) y Casmuz *et al.*, (2010), establecen que las larvas del gusano cogollero tiene mayor preferencia por plantas más jóvenes que las plantas de mayor desarrollo.

El híbrido Synko inició floración a los 45 días después de siembra. La emisión de polen comenzó a los 50 días después de la siembra. La floración coincidió con las descripciones oficiales de la semilla producida por Syngenta

8.2. RECOLECCIÓN DEL POLEN.

La hora en que fue recolectado el polen fue antes de las 7:00 am, la temperatura fue de 25.2 y 27.5 °C y La humedad relativa de 79% y 78%, para la primera y segunda replica respectivamente. Estos valores están dentro del rango mínimo de los requerimientos mínimos del maíz para una buena producción en la zona. Lo anteriormente coincide con Bonilla (2009), quien establece que la temperatura óptima requerida en la etapa de floración para una buena producción en el cultivo de maíz debe estar entre, 21-30°C. Corazza *et al.*, (2016), proponen recolectar polen a una temperatura de 27,2 °C y la humedad relativa de 72%. Las variables temperatura y humedad relativa en campo influyen en la germinación del polen en el medio de cultivo porque afectan el estado de turgencia de la membrana del grano de polen.

8.3. EVALUACIÓN DEL POLEN DE MAÍZ EN MEDIOS DE CULTIVO *IN VITRO*.

En ensayos previos de germinación (datos no mostrados), se comprobó que el polen de maíz del híbrido Synko sembrado dos horas después de recolectado y/o

conservado a 4° C por 24 horas, no logró germinar en ningún medio de cultivo probado. Respecto a lo anterior Youmbi *et al.*, 2005., Almeida 2009 y Garduño *et al.*, 2011, consideran al polen de maíz trinucleado, el cual presenta una longevidad corta, con una alta tasa de deshidratación, que es regida por la pared de la membrana, además son difíciles de germinar *in vitro* y tienen una tasa de conservación pobre debido a que su metabolismo es rápido y no se detiene después de ser desprendido de la antera.

El polen de maíz del híbrido Synko evidenció una adecuada germinación a dos horas después de incubado en el medio de cultivo sembrado de inmediato una vez cosechado. El crecimiento del tubo polínico se produjo; motivo por el cual los conteos fueron realizados con éxito a partir de las dos horas de ser sembrado *in vitro*. Lo anterior concuerda con Youmbi *et al.*, (2005), quienes afirman haber obtenido los porcentajes de medias de germinación óptimos dos horas después de incubado el polen.

Se presentaron diferencias estadísticas entre las cinco formulaciones para evaluar el porcentaje de germinación de polen *in vitro* del híbrido Synko, (Cuadro 3). El análisis de varianza mostró que existen diferencias entre los medios de cultivo probados.

Cuadro 3. Análisis de varianza para el porcentaje de germinación de polen del híbrido Synko de maíz, sobre cinco tratamientos analizados en el diseño estadístico. Universidad del Magdalena, 2016.

Fuente	Suma de cuadrados	Gl	Cuadrado medio	Razón- F	Valor-P
Tratamientos	150796,0	4	37699,1	210,756	0,0000
Error	56345,8	315	178,875		
Total (Corr.)	207142,0	319			

Las diferencias encontradas en los tratamientos fueron citados por Youmbi *et al.*, 2005. Davide *et al.*, 2009., Marini *et al.*, 2010 y Almeida *et al.*, 2011 quienes señalan que la germinación del polen en un medio de cultivo de un mismo genotipo puede variar, al usar diferentes formulaciones de ahí que se deba de ajustar las concentraciones de los reactivos al genotipo. La mejor formulación para el híbrido Synko fue la Cuatro, constituido por 0,6% de Agar-Agar, 17% de sacarosa, 0,03% de nitrato de calcio y 0% de ácido bórico (figura 12) para lograr 70.13% de germinación. Los otros medios no alcanzaron a superar el 50% de germinación de polen.

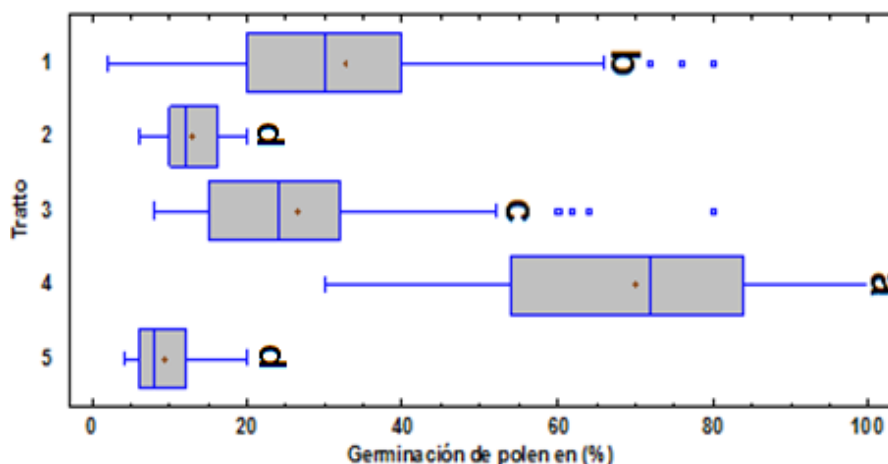


Figura 12. Germinación media de granos de polen de maíz, en cinco tratamientos. Cajas con la misma letra no son significativamente diferentes para la prueba de rangos múltiples Duncan a 5% de significancia estadística. Universidad del Magdalena, 2016.

Se evidencio para el caso de Agar-Agar diferencias estadísticas entre las tres concentraciones evaluadas en los medios para el porcentaje de germinación de polen *in vitro* de maíz (Cuadro 4).

Cuadro 4. Análisis de varianza para el porcentaje de germinación de polen del híbrido Synko de maíz, sobre tres concentraciones de Agar-Agar. Universidad del Magdalena, 2016.

Fuente	Suma de cuadrados	Gl	Cuadrado medio	Razón- F	Valor-P
Tratamientos	19486,1	2	9743,04	16,46	0,0000
Error	187656,	315	591,974		
Total (Corr.)	207142,	319			

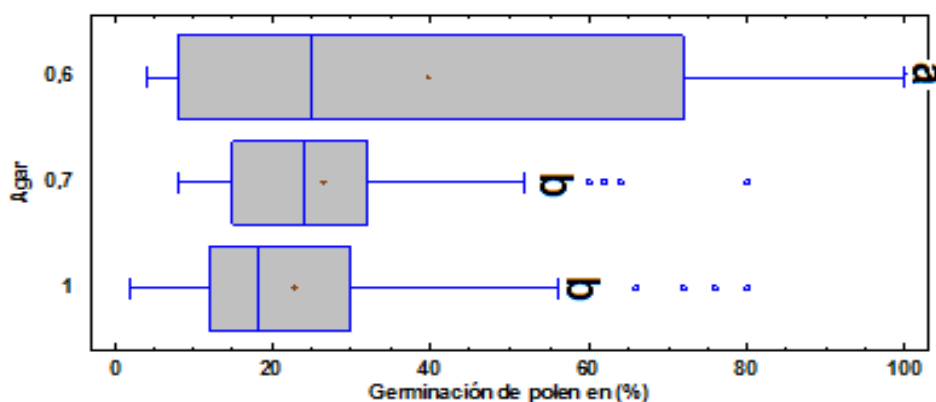


Figura 13. Germinación media de granos de polen de maíz, en tres concentraciones de Agar-Agar. Cajas con la misma letra no son significativamente diferentes para la prueba de rangos múltiples Duncan a 5% de significancia estadística. Universidad del Magdalena, 2016.

La concentración de 0.6% Agar-Agar logró germinar un promedio de 39.65%, aunque los valores de desviación estándar muestran un rango amplio que permite dilucidar que alrededor de esta concentración puede estar la cantidad óptima para dar energía al polen de germinar por su riqueza en calcio y magnesio, elementos

necesarios para desencadenar reacciones fisiológicas que inducen la elongación del tubo polínico. La concentración de 0.7 y 1% de Agar-Agar se comportaron igualmente logrando germinar 26.37% y 22.75% respectivamente (figura 13). Almeida *et al.*, (2011), registraron en maíz la mejor concentración de Agar fue de 0.7%; en contraste con Davide *et al.*, (2009), quienes reportaron 1.2% de agar. Pfahler, 1981., Santos *et al.*, 1998., Cerovic *et al.*, 2014 y Corazza *et al.*, 2016 reportan haber promovido la germinación *in vitro* de polen de maíz, usando concentración de agar de 0.6% y bacto-agar a la misma concentración.

Almeida *et al.*, (2011), proponen que la consistencia del medio puede ser controlada mediante el uso de agar, el cual facilita la evaluación de la germinación del polen en el medio de cultivo; y altas concentraciones podrían servir como barrera física, al impedir la germinación del tubo polínico. Mostraron que con los genotipos utilizados no existe impedimento en germinar polen de maíz hasta con 1% de agar.

Stanley y Linskens (1974), afirman que se utiliza normalmente agar para germinar polen. Por lo que, este suministra la humedad relativa constante y varios carbohidratos u otros estimulantes del crecimiento del polen, que pueden ser incorporados en el medio. La solides del agar así como las concentraciones, afectan la disponibilidad de humedad y la germinación. Las condiciones aeróbicas son muy buenas en la superficie de placas con agar, al igual que la facilidad con que se pueden manejar y la posibilidad de preparar montajes permanentes.

Se presentaron diferencias estadísticas entre las cinco concentraciones de sacarosa para el porcentaje de germinación de polen *in vitro* de maíz (Cuadro 5).

Cuadro 5. Análisis de varianza para el porcentaje de germinación de polen del híbrido Synko de maíz, sobre cinco concentraciones de sacarosa. Universidad del Magdalena, 2016.

Fuente	Suma de cuadrados	Gl	Cuadrado medio	Razón- F	Valor-P
Tratamientos	150796,	4	37699,1	210,76	0,0000
Error	56345,8	315	178,875		
Total (Corr.)	207142,	319			

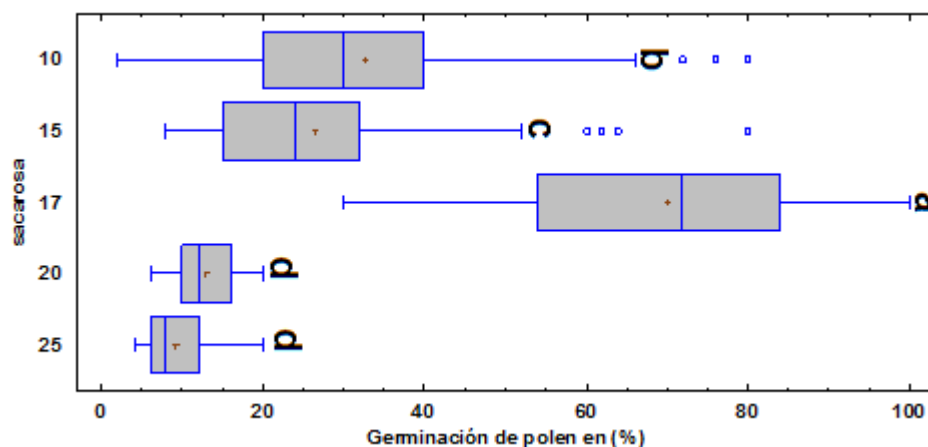


Figura 14. Germinación media de granos de polen de maíz, en cinco concentraciones de sacarosa. Cajas con la misma letra no son significativamente diferentes para la prueba de rangos múltiples Duncan a 5% de significancia estadística. Universidad del Magdalena, 2016.

La concentración de 17% en el medio de crecimiento permitió detectar un 70.12% de germinación (figura 14), la desviación estándar es de 18,9 lo que indica que hay que evaluar más cantidad de granos de polen y mirar si esta es la medida adecuada para suministrar carbonos al medio para satisfacer sus necesidades al crecimiento del polen ya que la fotosíntesis está ausente. La sacarosa es el azúcar más común en la preparación de los medios de cultivo se sugiere probar otros

azúcares como la glucosa o fructosa que reducen la hidrólisis en el tejido. Las concentraciones de sacarosa por encima y por debajo redujeron la germinación del polen quizás porque se inhiben el cambios fisiológicos de los tejidos, en este caso desarrollar tubo polínico. Taylor y Hepler (1997), confirman que eso es debido a que la sacarosa en el medio de germinación, puede alterar la permeabilidad del crecimiento del tubo polínico, resultando en la lixiviación de metabolitos e iones al medio. Se dice también que la sacarosa estimula la fermentación del etanol durante el crecimiento *in vitro* y se acumula a niveles de 100 mM que inhibe el crecimiento. Concentraciones adecuadas proporcionan la energía para el desarrollo del tubo polínico y probé un balance osmótico entre el polen y la solución de germinación (Vieira *et al.*, 2009 y Almeida *et al.*, 2011). Además este componente puede minimizar el crecimiento de hongos (Stanley y Linskens, 1974).

Almeida *et al.*, (2011), obtuvieron el mayor porcentaje de germinación de polen de maíz con la concentración de 17% de sacarosa, superando el 70% de germinación. Davide *et al.*, (2009), confirman haber obtenido los mejores resultados al hacer germinar polen de maíz, a una concentración de sacarosa 16,5%.

Youmbi *et al.*, (2005), obtuvieron los mejores resultados de germinación en concentraciones entre 10 y 15% de sacarosa. A partir de 20% la germinación del polen de las tres variedades de maíz decreció drásticamente, hasta quedar totalmente inhibida a 30% de sacarosa.

Rosell *et al.*, (1999), utilizó medios de germinación *in vitro* sobre polen de chirimoya, indicó que al aumentar el porcentaje de sacarosa, al 20% decreció el porcentaje de polen germinado, y al 30%, la germinación fue nula.

Las concentraciones empleadas de ácido bórico en las formulaciones presentaron diferencias para inducir la germinación de polen *in vitro* de maíz (Cuadro 6).

Cuadro 6. Análisis de varianza para el porcentaje de germinación de polen del híbrido Synko de maíz, sobre cuatro concentraciones de ácido bórico. Universidad del Magdalena, 2016.

Fuente	Suma de cuadrados	Gl	Cuadrado medio	Razón- F	Valor-P
Tratamientos	31968,1	3	10656,0	19,22	0,0000
Error	175174,0	315	554,348		
Total (Corr.)	207142,0	319			

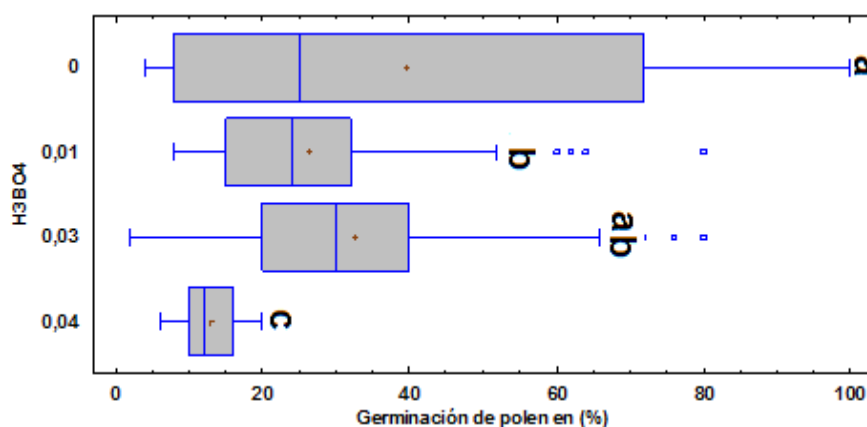


Figura 15. Germinación media de granos de polen de maíz, en cuatro concentraciones de ácido bórico. Cajas con la misma letra no son significativamente diferentes para la prueba de rangos múltiples Duncan a 5% de significancia estadística. Universidad del Magdalena, 2016.

La concentración de 0 y 0.03% permitió alcanzar la mayores cantidades de polen germinado (figura 15); el tratamiento que no incluyó ácido bórico fue el que contuvo los registros más altos de germinación. Se sabe que el Boro en las monocotiledóneas no es tan requerido como en las dicotiledóneas pero aun así, el Boro es requerido para el transporte de azúcares entre muchas otras funciones;

una deficiencia de él causa deterioro en el crecimiento de los puntos meristemáticos; de ahí que las concentraciones correctas permitirán el desarrollo del crecimiento del tubo polínico. La concentración de 0,04% redujo la germinación del grano de polen. Pfahler (1967) reportó que los mejores resultados de germinación en polen de maíz los alcanzo con concentraciones de 0,01% de ácido bórico.

La concentración de Nitrato de calcio en sus diferentes formulaciones, presentó diferencias estadísticas entre el porcentaje de germinación de polen *in vitro* de maíz (Cuadro 7). La concentración de 0.03 concentró el valor de media más alto entre las otras formulaciones (Figura 16). Pfahler (1967) y Almeida *et al.*, (2011) consiguieron los mejores resultados de germinación de polen de maíz a una concentración de calcio 0.03% también.

Cuadro 7. Análisis de varianza para el porcentaje de germinación de polen del híbrido Synko de maíz, sobre cuatro concentraciones de nitrato de calcio. Universidad del Magdalena, 2016.

Fuente	Suma de cuadrados	Gl	Cuadrado medio	Razón- F	Valor-P
Tratamientos	150361,0	3	50120,4	278,93	0,0000
Error	56780,9	315	179,686		
Total (Corr.)	207142,0	319			

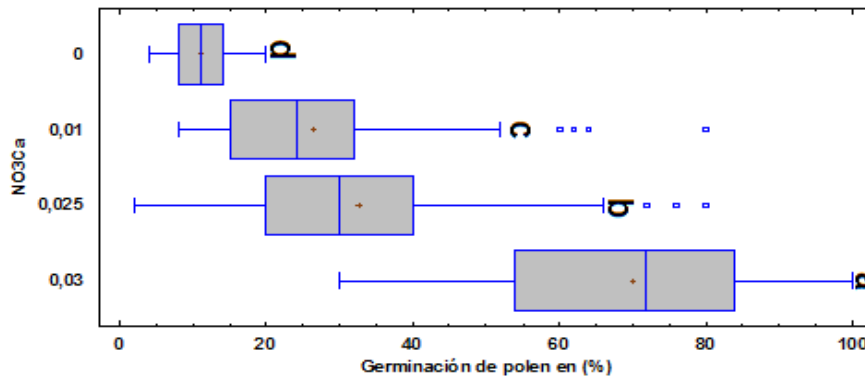


Figura 16. Germinación media de granos de polen de maíz, en cuatro concentraciones de nitrato de calcio. Cajas con la misma letra no son significativamente diferentes para la prueba de rangos múltiples Duncan a 5% de significancia estadística. Universidad del Magdalena, 2016.

El calcio no es un elemento móvil dentro de la planta, el calcio se debe transportar al nuevo punto de crecimiento para su uso; la transpiración en la planta es quien moviliza el calcio, cuando el calcio es deficiente en los puntos de crecimientos, la formación de la pared celular es distorsionada. Los estudios han indicado que la unión de calcio toma lugar en las regiones pépticas de la pared del tubo de polen, lo que aumenta la rigidez de la pared y la estabilidad con una disminución en la ruptura (Pfahler, 1967). El calcio en un medio de cultivo proporciona características fisiológicas al tubo polínico y al grano de polen, dándole menor sensibilidad a los cambios en el medio básico, menor permeabilidad, crecimiento en un aspecto lineal y rígido del tubo polínico.

La acción del calcio sobre el grano de polen está aparentemente asociada con la membrana del tubo polínico. Por lo tanto en ausencia de calcio hay una mayor permeabilidad de la membrana del tubo polínico, provocando la liberación de metabolitos internos al medio externo (Vieira *et al.*, 2009).

La comparación entre la técnica de germinación de polen con la técnica de tinción (Cuadro 8), evidenció que los porcentajes de viabilidad fueron superiores al teñir el polen que al inducir su germinación a través de los cinco medios de cultivo (figura

17). Según lo anterior, Gonzales *et al.*,(2002) en papa y Andrés (1999), en clones de Albaricoquero coinciden con estos resultados, y establecen que las diferencias entre la técnica de germinación y la tinción con acetocarmin; esta última sobre estima la viabilidad debido a que detecta elementos celulares y enzimáticos funcionales los cuales no garantizan que el polen sea viable. Lo cual es demostrado por Gonzales *et al.*, (2002), quienes indican que el carmín tiñen el citoplasma vivo y muerto, por lo tanto se genera la sobre estimación de la fertilidad del polen.

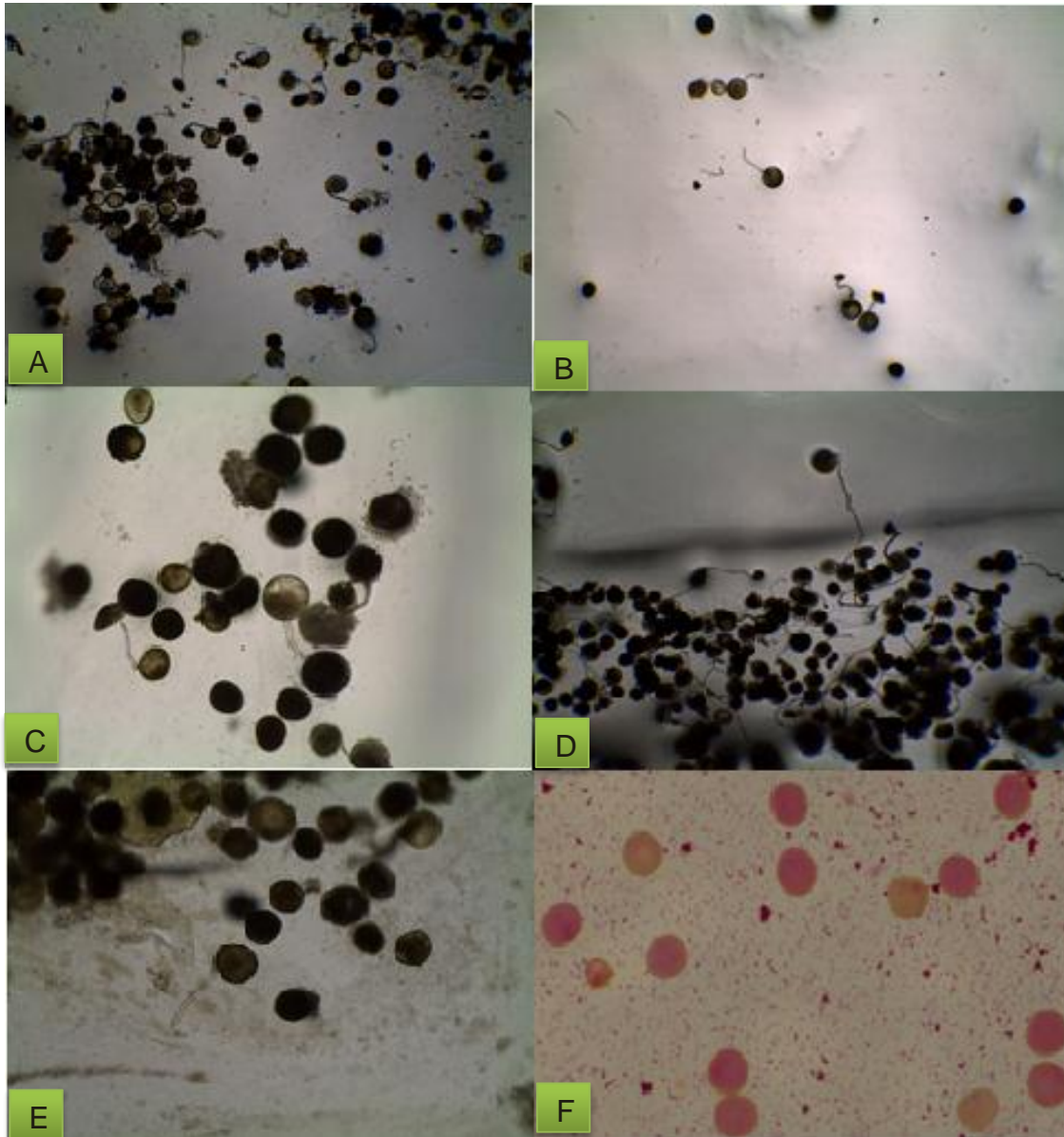


Figura 17. Polen de maíz evaluado en diferentes medios por la técnica de germinación *in vitro*. A, medio 1. B, medio 2. C, medio 3. D, medio 4. E, medio 5. F. Determinación de viabilidad por la técnica de tinción con Acetocarmin.

Cuadro 8. Resumen estadístico para el porcentaje de germinación de polen del híbrido Synko de maíz y el porcentaje de viabilidad. Universidad del Magdalena, 2016.

Resumen estadístico	Germinación del polen en (%)	% de Viabilidad
Recuento	320	20
Media	30,24	96.25
Desviación estándar	25.48	1.83
Coefficiente de variación	84.27%	1.9

9. CONCLUSIONES

- Para el polen de *Zea mays* del híbrido Synko, el medio de germinación que resulto más apropiado está compuesto por: 0.6% de Agar-Agar, 17% de sacarosa, 0% de ácido bórico y 0.03% de nitrato de calcio.
- El polen de maíz después de dos horas de incubación en un medio de cultivo presenta un óptimo porcentaje de germinación y desarrollo del tubo polínico.
- El polen de maíz es de difícil germinación cuando es expuesto al ambiente.

10. RECOMENDACIONES

- Se sugiere aplicar las mismas formulaciones en otros genotipos de maíz para evaluar el porcentaje de germinación *in vitro*.

REFERENCIAS

- ALCARAZ, M^a. Biología reproductiva del aguacate (*Persea americana* mill.). implicaciones para la optimización del cuajado. Tesis doctoral. Málaga. España: Universidad de Málaga, Facultad de Ciencias, Departamento de Microbiología. 2009, p6, p33-35.
- ALMEIDA, V. Determinación de las condiciones adecuadas de pre-tratamientos frío y las dosis óptima de radiación gamma CO⁶⁰, para realizar cultivo *in vitro* de microsporas aisladas de maíz de las variedades INIAP-101 e INIAP-601. Tesis para optar el grado de ingeniero en biotecnología. Sangolquí. México: Escuela politécnica del ejército, Departamento de ciencias de la vida. 2009, p3-9.
- ALMEIDA, C., LEITE, A., BARBOSA, J Y CRUZ, M. Conservação e germinação *in vitro* de pólen de milho (*Zea mays subsp. mays*). En: Revista Brasil. Bot. 2011, Vol. 34, no, 4, p493-497.
- ALBURQUERQUE, N., García, F y Burgos, L. Short communication. Influence of storage temperatura on the viability of sweet cherry pollen. En: Spanish Journal of Agricultural Research. Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria INIA. España, 2007, Vol. 5, no, 1, p86-90.
- ANDRES, M, V., RODRIGUEZ, J y DURAN, J, M. Viabilidad del polen del albaricoquero (*Prunus armeniaca* L.). En. Investigación Agrícola: Producción y Protección Vegetal. Madrid. 1999, Vol. 14, no (1-2), p25-32.
- ARAMÉNDIZ H., CARDONA, C y TORRES, E. Germinación del Polen de Berenjena (*Solanum melongena* L.) en Condiciones *in vitro*. En: Revista Facultad Nacional Agraria de Medellín. 2012, Vol. 65, no, 2, p6637-6643.
- BONILLA, N. Manual de recomendaciones técnicas del cultivo de maíz. Instituto Nacional de Innovación y transferencia en tecnología Agropecuaria (INTA). San José-Costa Rica. 2009, p9-30.
- ARAMÉNDIZ, H., CARDONA, C y JARMA, A. Eficiencia de dos métodos para evaluar la viabilidad del polen de berenjena (*Solanum melongena* L.

- cv. Lila criolla). En: revista U.D.C.A Actualidad y Divulgación Científica, Julio-Diciembre de 2013, Vol. 16, no, 2, p351 – 358.
- BEDINGER, P. The remarkable Biology of Pollen. University of North. The Plant Cell. Department of Biology. American Society of Plant Physiologist. Carolina. 1992, Vol. 4, p879-887.
 - CASMUZ, A., JUÁREZ, L., SOCÍAS, G., MURÚA, G., PRIETO, S., MEDINA, S. y GASTAMINZA, G. Revisión de los hospederos del gusano cogollero del maíz, *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). En: Revista de la Sociedad Entomológica Argentina, Julio-Diciembre de 2010, vol. 69, no 3-4, p. 209-231.
 - COE E.H., NUEFFER, M y. HOISINGTON, D. The genetics of maize. En: G.F. Sprague y J.W. Dudley (eds.), Corn and corn improvement, 3rd. ed., Agronomy Monographs, American Society of Agronomy, Madison, WI, USA.1988. No.18, p. 81-236.
 - CEROVIC, R., PAJIC, Z., FILIPOVIC, M., FOTIRIC, M., RADICEVIC, S., NIKOLIC, D Y DORDEVIC. M. Pollen germination and pollen tube growth in zp maize lines. University of Belgrade. Innovation Centre. Faculty of technology and Metallurgy. Belgrade, Serbia. 2014, Vol. 46, No.3, p935-948.
 - CORAZZA, K., CHIAPETTI, R., FOCA, L., MULLER, A., BORGHETTI, G y CHAVES, E. Viability of maize pollen grains *in vitro* collected at different times of the day. En: African Journal of Agricultural research. July -February of 2016, Vol. 11, no, 12, p1040-1047.
 - CORCUERA, R. Desarrollo y evaluación de nuevo germoplasma de maíz (*Zea mays* L.) para uso especial en Argentina. Tesis Doctoral. Argentina: Universidad Politécnica de Valencia, Departamento de Producción Vegetal, 2012, p12-28.
 - DAFNI, A y FIRMAGE, D. Pollen viability and longevity: practical, ecological and evolutionary implications. En: Plant Systematics and Evolution, 2000, vol. 222, no 1, p113-132.

- DAVIDE, L., PEREIRA, R., ABREU, G., DE SOUZA, J., & VON PINHO, É. V. D. R. Viabilidade de pólen de milho em diferentes períodos de armazenamento em baixa temperatura. *Revista Brasileira de Milho e Sorgo*, 2009, Vol. 8, no, 2, p199-206.
- DAVARYNEJAD, G., SZABÓ, Z., NYEKI, J. y SZABÓ, T. Phenological stages pollen production level, pollen viability and *in vitro* germination capability of some sour Cherry Cultivars. En: *Asian Journal of Plant Sciences*, 2008, Vol. 7, no, 7, p672-676.
- GARDUÑO, N., NÚÑEZ, C., PECINA, V., MONTERO, V., MONTES, N., GONZÁLEZ, M Y ANAYA, J. Desarrollo de un método eficiente para la germinación *in vitro* de polen de sorgo. Guanajuato, México. En: *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 2011, vol. 14, p901-906.
- GONZÁLEZ, M., ESTÉVEZ, A., CASTILLO, J., SALOMÓN, J., OLIVIA, M y HERNÁNDEZ, M. La Calidad del Polen: Requisito Indispensable del Mejoramiento Tradicional de la Papa en Cuba. En: *Revista Latinoamericana de la Papa*. 2002, Vol. 13, p75-94.
- HERNÁNDEZ, J. Técnicas de Cruzamiento y Polinización en Chile Jalapeño (*Capsicum annuum* L.). Tesis Presentada Como Requisito Parcial Para Obtener el Título de: Ingeniero Agrónomo en Producción. Buenavista: México: Universidad Autónoma Agraria "Antonio Narro": División de Agronomía. 2003, 17p.
- HERNÁNDEZ, M. Evaluación de la viabilidad del polen almacenado de genotipos de arándano (*Vaccinium spp.*). Tesis para optar el grado de ingeniero de licenciado en ingeniería agronómica. Zamorano. Honduras: Escuela agrícola Panamericana. 2010, p1-3.
- HICKEY, M y KING, C. 100 families of flowering plants. Cambridge University Press. New York. 2007, p489-493.
- JARAMILLO, P. La flor y otros órganos derivados. Colombia. 2006, 88p
- Jaramillo, Á., Jaramillo, O., Bustillo, A., y Gómez, H. Efecto del gusano cogollero *spodoptera frugiderpa* (je smith) sobre el rendimiento del maíz. En: *Revista Facultad Nacional de Agronomía*, 1989, vol. 42, No 1, p. 25-33.

- KIESSELBACH, TA. 1980. The structure and reproduction of corn. University of Nebraska Press. USA. P. 1-50.
- KEARNS, C y INOUE, D. Techniques for pollination Biologist. University press of Colorado, Niwot, Colorado. 1994, p.90-100.
- LAZENBY W.R. 1898. The flowering and pollination of Indian corn. Proc. Soc. Prom. Agr. Res., p.123-129.
- MARINI, G., ARENAS, R y TOGNO, L. Efecto de los medios de cultivo sobre la germinación *in vitro* de granos de polen en poblaciones de *Cucurbita máxima*. En: Horticultura Argentina, 2010, Vol. 29, No, 70. p18-21.
- Mackean, D. Plantas: Estructura de la flor. [En línea]. 2016. [Fecha de consulta: 4 de septiembre de 2016]. Disponible en: <http://www.biology-resources.com/plants-flowers.html>
- ORDOÑEZ, B. Determinación de la Viabilidad y Fertilidad del Polen. Centro Internacional de la Papa (CIP), Lima, Perú, 2014. 8p.
- ORRILLO, M y BONIERBALE, M. Manual técnico: Biología Reproductiva y Citogenética de la papa. Centro Internacional de la Papa (CIP), 2009, p14-21.
- ORDOÑEZ, B y BONIERBALE, M. Manual de Biología reproductiva y citogenética de la papa. Segunda edición. Centro Internacional de la Papa (CIP), Lima, Perú. 2015, 29p.
- ORTIZ, E., CARBALLO, A., MUÑOZ, A y GONZÁLEZ, F. Efecto de la dispersión de polen en la producción de semilla de maíz, en Texcoco, México. Agron. Mesoam vol. 21, no, .2 San Pedro Dec. 2010. [en línea]. México, 2010. [Fecha de consulta: 14 de mayo de 2016]. Disponible en:< http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1659-13212010000200008 >.
- OSPINA, M y LIGARRETO, G. Análisis de la calidad del polen en genotipos de papa *Solanum tuberosum* ssp. *andigena* y reacción a *Phytophthora infestans* en progenies. En: Agronomía Colombiana, 2000, Vol. 17, p69-72.

- PALMA, C. Evaluación de la viabilidad polínica de cuatro especies pertenecientes al género *Berberis* L. (Berberidaceae). Tesis presentada como parte de los requisitos para optar al grado de Licenciado en Agronomía. Valdivia–Chile: Universidad Austral de Chile. Facultad de Ciencias Agrarias. Escuela de Agronomía 2010, p22-45.
- PALIWAL, R. L. EL MAÍZ EN LOS TRÓPICOS: Mejoramiento y producción. Introducción al maíz y su importancia.[en línea]. Roma, 2001. [Fecha de consulta: 10 de marzo de 2016]. Disponible en: <http://www.fao.org/docrep/003/x7650s/x7650s00.htm#toc>
- PARDEY, R. C. Producción de semilla y cruzamientos entre accesiones de maíz del departamento del Magdalena, Colombia. Revista Acta Agronómica. 2015. Vol. 64, núm. 1 p83 - 92 ISSN O120 – 2812.
- PFAHLER, P. In vitro germination and pollen tube growth of maize (*zea mays* L.) Pollen: Calcium and Boron Effects. University of Florida. Department of Agronomy, Gainesville, Florida. 1967. Vol. 45, p839-845.
- PFAHLER, P. *In Vitro* Germination Characteristics of Maize Pollen to Detect Biological Activity of Environmental Pollutants. University of Florida. Department of Agronomy, Gainesville, Florida. 1981. Vol. 37, p125-132.
- REJÓN, J., SUÁREZ, C., ALCHE, J., CASASTRO, A & RODRÍGUEZ-GARCÍA, M. Evaluación de diferentes métodos para estimar la calidad del polen en distintos cultivares de olivo (*Olea europaea* L.). España. 2010, p1-2.
- ROSELL, P., HERRERO, M Y SAÚCO, V. Pollen germination of cherimoya (*Annona cherimola* Mill.) In vivo characterization and optimization of in vitro germination. España. En: Scientia Horticulturae. 1999, vol. 81, no 3, p251-265.
- RODRÍGUEZ, J. Biología de polen y estigmas en especies de Zea. Seminario de investigación, para obtener el título de Ingeniero Agrónomo. México. Universidad de Guadalajara, Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias, 2004, p3-27.

- SANCHEZ, L y ROMERO, M. Viabilidad y morfología del polen de diferentes materiales de palma de aceite. Cenipalma ISSN 0123-8353. Colombia. 2013, p61-72.
- SANTOS, A., ALMEIDA, M, J., SANTOS, I y SALEMA, R. Biochemical and Ultrastructural Changes in Pollen of *Zea mays* L. Grown Under Enhanced UV-B Radiation. Portugal. En: Annals of Botany Company 82. January-july de 1998, p641-645.
- SANTOYO, A. Polinización del maíz. Tesis para obtener el título de ingeniero agrónomo orientación fitotecnia. Universidad de Guadalajara. Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias, 2004, p2-4.
- SHEKARI, A., NAZERI, V y SHOKRPOUR, M. Pollen viability and storage life in *Leonurus Cardiac* L. Iran. En: Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants. 22 de febrero de 2016, p1-4.
- STANLEY, R y LINSKENS, H. Pollen: biology biochemistry management. Springer Science & Business Media. University of Florida. New York. 1974, p65-67, 255-258.
- SORKHEH, K., SHIRAN, B., ROUHI, V., KHODAMBASHI, M., WOLUKAU, J y ERCISLI, S. Response of in vitro pollen germination and pollen tube growth of almond (*Prunus dulcis* Mill.) to temperature, polyamines and polyamine synthesis inhibitor. En: Biochemical Systematics and Ecology. Vol. 39. June –august de 2011, p749–757.
- STURTEVANT, E. The superabundance of pollen in Indian corn. Am. Nat. 1881. 15: 1000.
- TAYLOR, L y HEPLER, P (1997). Pollen germination and tube growth. Department of Genetics and Cell Biology, Washington State University, Pullman, Washington. En Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. Vol. 48, No, 1. 1997, p461-491.
- VAN, L y BRAVO, R. Observaciones sobre floración y viabilidad del polen en Maíces Mejoradas y “Criollos”, en la Villa del Rosario, Estado Zulia. En: Revista de la Facultad de Agronomía. Vol. 2, No, 4. Enero-junio 1974, p40-43.

- VARAS, J. Factores que afectan la germinación de polen del cacao *in vitro*. Tesis para optar el grado de Magister en agricultura. Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas de la OEA. Costa Rica, 1961, p3-4.
- VIEIRA, L., NASCIMENTO, M., CARMONA, R y ALVES, R. Viability of eggplant pollen. En: Crop Breeding and Applied Biotechnology, Brazil, March-July 2009, vol, 9, p320-327.
- YOUNBI, E., THE, C., y TEDJACNO, A. Conservation of the germination capacity of pollen grains in three varieties of maize (*Zea mays* L.). Grana. vol. 44, no 3. 2005, p152-159.